

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

**Modulation de NF- κ B par
Lactobacillus helveticus R389**

Thèse présentée à la faculté des études supérieures et de la
recherche en vue de l'obtention de la maîtrise ès sciences
(biochimie)

Présentée par : Jean-François Mallet

Université de Moncton
Département de chimie et biochimie
2011



UNIVERSITÉ DE MONCTON
EDMUNDSTON MONCTON SHIPPAGAN



Library and Archives
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-81211-2
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-81211-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tout d'abord la Dre Chantal Matar. Son aide et son appui furent importants dans le développement de ma recherche. Elle m'a permis de mieux développer mes connaissances et mes habiletés autant en recherche que dans la vie de tous les jours.

Je désire aussi remercier très sincèrement ma famille pour leur soutien moral et financier. Ils attendent depuis bien longtemps que je termine mes études.

Merci au département de chimie-biochimie, pour toutes les connaissances que ses professeurs ont sus nous partager, mais tout particulièrement le Dr Didier Gauthier qui avait toujours sa porte grande ouverte. Ensuite, un merci spécial à Mme Nora Boudreau qui nous accueille toujours avec un sourire et qui sait toujours trouver ce qui nous manque.

Je tiens aussi à souligner ma gratitude envers le laboratoire de recherche en métabolisme cellulaire des lipides et le Dr Marc Surette. Je suis reconnaissant non seulement pour le prêt des équipements, mais aussi pour toute l'aide technique de Luc Boudreau, Philippe-Pierre Robichaud et Rachel Morin.

Finalement, j'aimerais remercier M. Jairo Duarte pour m'avoir appris les manipulations des animaux nécessaires pour compléter ma recherche et pour son aide plus que généreuse avec les nombreuses cultures cellulaires.

SOMMAIRE

Les humains peuvent être comparés à un écosystème. Ils vivent en coexistence avec environ 10^{12} microorganismes sur la peau et 10^{14} microorganismes à l'intérieur du système digestif. Pour mettre ce nombre en perspective, il est généralement accepté que le corps soit composé de 10^{13} cellules humaines. L'ensemble de ces microorganismes présent dans le système digestif se nomme microbiote. Il est maintenant clair qu'une relation existe entre le microbiote et l'hôte puisque les microorganismes présents dans l'intestin permettent une absorption adéquate des nutriments, une maturation du système immunitaire et un bon développement des tissus de l'intestin.

Plusieurs exemples de microorganismes utilisés comme source de nourriture sont observés un peu partout dans le monde comme le yogourt, le kéfir et le kombucha. Les microorganismes ayant des bienfaits sur la santé de l'hôte se nomment probiotiques. *Lactobacillus helveticus* est utilisé dans plusieurs produits fermentés comme les fromages suisses, les fromages italiens et le lait fermenté. Cette bactérie est principalement utilisée dans la création des fromages puisqu'elle en adoucit le goût et ajoute une touche de noix et de chêne aux produits fermentés.

La consommation de probiotiques permet de contrôler la durée des épisodes de diarrhée reliés à l'utilisation d'antibiotiques, de réduire l'inflammation et de prévenir certains cancers. Le *Lactobacillus helveticus* R389 agit sur la production de nombreuses cytokines pro- et anti-inflammatoires. Il a été démontré auparavant dans des expériences *ex vivo* que *L. helveticus* R389 agirait partiellement sur le récepteur TLR-4. Nous avons donc émis l'hypothèse que *L. helveticus* R389 agit sur la production de cytokines en initiant la translocation de NF- κ B. NF- κ B, qui est une voie importante de l'inflammation, est aussi dérégulée dans de nombreux cancers.

Nous avons donc testé, sur des souris femelles Balb/c, l'effet de la consommation de lait fermenté pendant 7 jours sur la prévention de la translocation de 2 sous-unités de NF- κ B et de 2 médiateurs de l'inflammation lors d'une provocation par *Escherichia coli* MM294.

L'analyse des résultats d'immunobuvardage de western a révélé que la consommation de lait fermenté par *L. helveticus* R389 a permis de prévenir la translocation des sous-unités P50 et

P65 de NF- κ B vers le noyau des cellules épithéliales de l'intestin. La diminution des signaux inflammatoires IL-6 et CCL3 dans le surnageant a aussi été observée appuyant ainsi les effets obtenus par immunobuvardage. *L. helveticus* R389 possède donc une partie de ses effets bénéfiques dus à une action sur la voie de signalisation NF- κ B, mais les intermédiaires ne sont toujours pas identifiés.

SUMMARY

The human body can be compared to an ecosystem. Human cells coexist with approximately 10^{12} microorganisms on the skin and 10^{14} microorganisms in the digestive track. To put this number in perspective, it is generally accepted that the body is composed of 10^{13} human cells. The entire population of microorganisms present in the digestive tract is named microbiota or gut flora. It is now clear that a relation between the microbiota and the host exists because bacteria present in the intestine permit an adequate absorption of nutrients, a maturation of the immune system and regulate the proper development of the gut.

Many microorganisms are used in the production of food around the world like yogurts, kefir and kombucha. Microorganisms that have benefits for the host are named probiotics. *Lactobacillus helveticus* is used in many fermented products like Swiss cheese, Italian cheese and fermented milks. The wide usage of this bacterium in cheese making is explained by its ability to prevent bitterness and it also adds a nutty and oaky flavor to fermented products.

The consumption of probiotics can reduce the duration of diarrhea associated with antibiotics, control inflammation and prevent the incidence of certain cancers. *L. helveticus* R389 influences the production of many pro- and anti- inflammatory cytokines. It was demonstrated before in *ex vivo* experiments that *L. helveticus* R389 interacts partially with TLR-4. With this knowledge, we postulated that *L. helveticus* R389 influences the production of cytokines by initiating the translocation of NF- κ B. NF- κ B is an important signaling pathway in inflammation and cancers.

We tested, on female Balb/c mice, the effect of the consumption of milk fermented with *L. helveticus* R389 for 7 days on the translocation of 2 sub-units of NF- κ B and 2 mediators of inflammation in an *Escherichia coli* MM294 challenge test.

The Western blot analysis revealed that the consumption of milk fermented by *L. helveticus* R389 prevents the translocation to the nucleus of the NF- κ B sub-units P50 and P65 in epithelial intestinal cells. The diminution of the inflammatory signals IL-6 and CCL3 in the cultured cells supernatant confirm the Western blot results. A partial explanation for *L.*

helveticus R389 beneficial properties can be attributed to its action on the NF- κ B pathway but the intermediaries are still not resolved.

AVANT-PROPOS

· Cette thèse est écrite sous forme de thèse par article consistant d'une revue de la littérature reliée au domaine et un article soumis au Journal of Dairy Research. L'élaboration du projet a été réalisée par la Dre Chantal Matar. Les manipulations incluses dans la thèse et l'article scientifique ont été effectuées par l'étudiant sauf l'anesthésie et l'euthanasie des animaux effectuées par Jairo Duarte. Les manipulations reliées aux micropuces ont été exécutées par StemCore Laboratories (Ottawa, On) et l'analyse statistique de ces résultats par Gareth Palidwor de l'Ottawa Hospital Research Institute (Ottawa, On). Les coauteurs ont participé à la correction de l'article.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	i
Sommaire	ii
Summary.....	iv
Avant-propos	vi
Table des matières.....	vii
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations.....	xii
1. Introduction	1
2. L'intestin.....	2
3. L'inflammation	3
3.1. Médiateurs de l'inflammation	4
3.2. Infection par <i>Escherichia coli</i>	7
3 2 1 Lipopolysaccharide	8
4. Le microbiote	9
5. Les probiotiques.....	10
5.1. Prébiotique.....	12
5.2. <i>Lactobacillus helveticus</i>	13
5.3. Les mécanismes d'action des probiotiques.....	14
5 3 1 Concurrence avec les bacteries nefastes	15
5 3 2 Amelioration de la barriere intestinale	17
5 3 3 Des cellules epitheliales au systeme immunitaire	18
5 3 4 Les cellules dendritiques	19
5 3 5 Chimio prevention	23
6. NF-κB.....	23
6.1. NF-κB de classe 1.....	25
6.2. NF-κB de classe 2.....	27
6.3. Inhibition du NF-κB.....	28
6.4. Activation du NF-κB	31
6 4 1 La voie induite par la famille des TLR et IL-1R	32
6 4 2 La voie canonique induite par la famille des recepteurs du facteur de necrose tumorale	34
6 4 3 La voie non canonique induite par certains TNFR	35
6 4 4 Les autres voies	37

6.5. Le complexe IKK.....	37
7. Hypothèse de recherche et objectifs	39
8. Résultats expérimentaux	41
Abstract.....	42
Résumé.....	43
Introduction.....	44
Materials and methods	46
Results.....	49
Discussion	50
9. Conclusion	61
Bibliographie.....	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Résumé des mécanismes d'action des probiotiques dans l'intestin	14
Figure 2 : Physiologie de la membrane épithéliale des plaques de Peyer.	22
Figure 3 :Résumé du mécanisme d'activation de la voie de signalisation deNF-κB.....	25
Figure 4 : Structure caractéristique des protéines de la classe 1.....	26
Figure 5 : Structure caractéristique des protéines de la classe 2.....	28
Figure 6 : Structure caractéristique des inhibiteurs de la voie NF-κB.....	31
Figure 7 : Récepteurs activant NF-κB.	32
Figure 8 : Mécanisme d'activation de la voieNF-κB par les TLR.....	34
Figure 9 : Mécanisme d'activation de la voie NF-κB par le récepteur de TNF-α.	35
Figure 10 : Mécanisme d'activation de la voie non canonique de NF-κB par le récepteur BAFF.	36
Figure 11 : Structure caractéristique des kinases d'IκB.....	38
Figure 12: Representative result of a western blot for nuclear proteins extracted from cells from control mice or mice prefed fermented milk with <i>Lactobacillus helveticus</i> R389	53
Figure 13: Relative concentration of the p50 sub-unit of NF-κB.	54
Figure 14: Relative concentration of the p65 sub-unit of NF-κB.	55
Figure 15 : Effect of <i>L. helveticus</i> prefeeding on the concentration of CCL3 in small intestine epithelial cell culture supernatant	56
Figure 16: Effect of <i>L. helveticus</i> prefeeding on the concentration of IL-6 in small intestine epithelial cell culture supernatant	57

Figure 17 : Analyse qualitatif des échantillons soumis pour analyse par micropuce..... 58

Figure 18 : Segmentation des échantillons soumis à l'analyse par micropuce..... 59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Selection de quelques gènes analysés par micropuce.....	60
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
 AP-1 : “Activator protein 1”
 ATM : “Ataxia telangiectasia mutated”
 BAFF : “B-cell activating factor”
 BCL3 : “B-cell lymphoma 3-encoded protein”
 BCL10 : “B-cell lymphoma 10-encoded protein”
 CARD : “Caspase recruitment domain-containing protein 10”
 CCL3 : “Chemokine (C-C motif) ligand 3”
 CDm : Cellules dendritiques myéloïdes
 CDp : Cellules dendritiques plasmacytoïdes
 CHUK : “Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase” synonym de IKK- α
 c-IAP : “Cellular inhibitor of apoptosis protein 1”
 DC : Cellules dendritiques (“Dendritic cells”)
 DD : “Death domain”
 Dim : Partie responsable de la dimérisation
 ECSIT : “Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways”
 GALT : “Gut-associated lymphoid tissue”
 GGG : région riche en glycine
 HLH : Hélice-boucle-hélice
 HT-29 : Lignée cellulaire humaine provenant d’un adénocarcinome du colon de grade 2
 IEC : Cellules épithéliales de l’intestin
 I κ B : Inhibiteur de NF- κ B (“NF- κ B inhibitor”)
 IKK : Kinase d’I κ B (“I κ B kinase”)
 Il-1 : Interleukine-1
 Il-6 : Interleukine-6
 INAP : “IL-1 inducible nuclear ankyrin-repeat protein”
 IRAK : “IL-1R associated kinase”
 JNK : “Mitogen-activated protein kinase 8”
 LPS : Lipopolysaccharide
 LZ : Fermeture à glissière à leucine (“Leucine zipper”)
 MAIL : “Molecule possessing ankyrin repeats induced by lipopolysaccharide”
 MAL : “MyD88–adapter-like”
 MALT : “Mucosa-associated lymphoid tissue”
 MALT1 : “Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1”
 MEKK : “Mitogen-activated protein kinase kinase kinase”
 MyD88 : “Myeloid differentiation primary response gene (88)”
 NBD : Domaine de liaison à IKK γ (“NEMO Binding Domain”)
 NEMO : “NF-kappa-B essential modulator”
 NES : Séquence d’exportation nucléaire (“Nuclear export sequence”)

NF- κ B : Facteur de transcription nucléaire kappa B (“Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”)
NIK : Kinase induisant NF- κ B (“NF- κ B inducing kinase”)
NLS : Séquence de localisation nucléaire
p100 : Sous-unité p100 de NF- κ B
p105 : Sous-unité p105 de NF- κ B
p50 : Sous-unité p50 de NF- κ B
p65 : Sous-unité p65 de NF- κ B
PAF : “Platelet-activating factor receptor”
PEST : Séquence d’acides aminés riche proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T)
PIDD : “p53-inducible death-domain-containing protein”
RelA : Sous-unité p65 de NF- κ B
RHD : Domaine d’homologie de Rel (“Rel homology domain”)
RING : “Really interesting new gene”
RIP1 : “Receptor Interaction Protein 1”
SCF : “Skp, Cullin, F-box containing complex”
SUMO : “Small Ubiquitin-like Modifier”
TAB : “TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein”
TAD : domaine de transactivation (“Trans-activation domain”)
TAK : “TGF-beta activated kinase”
TBP : TATA binding protein
TIR : “Toll/IL-1R homology domain”
Tir : “Translocated intimin receptor”
TIRAP : “Toll-Interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein”
TLR-4 : Récepteurs de type Toll 4 (“Toll-like receptor 4”)
TNF α : Facteur de nécrose tumorale alpha (“Tumor necrosis factor-alpha”)
TNFR : Récepteur du facteur de nécrose tumorale
TRADD : “Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein”
TRAF6 : “TNF receptor associated factor 6”
TRIKA : “TRAF6-regulated IKK activator”
ZF : Domaine de doigt de zinc

1. Introduction

Les êtres humains ont considérablement amélioré leur espérance de vie depuis les 100 dernières années. Les avancements en santé, en alimentation et en médecine ont par le fait même augmenté son espérance de vie de 20 ans entre 1920 et 2005 au Canada (Statistique Canada 2008). Ces avancements n'ont pas seulement des bienfaits. L'augmentation d'agents synthétiques dans l'alimentation, la disponibilité de la viande diminuant la consommation de légumes et de fruits (Linos *et al.* 2008), la sédentarité (Lee 2003), les produits toxiques volatils (Boeglin *et al.* 2006) et le niveau de stress élevé (Thaker *et al.* 2006) ont augmenté le nombre de personnes souffrantes de maladies cardiaques et de cancers.

La prévalence de plusieurs maladies inflammatoires est devenue un problème de santé publique d'envergure. Les maladies inflammatoires de l'intestin ("Inflammatory Bowel Disease" IBD) sont parmi ces maladies émergentes, dont la recherche n'a pas bien réussi à élucider les mécanismes sous-jacents, quoique de l'IBD puisse se déclencher chez les personnes prédisposées génétiquement à cette maladie (Cuffari 2010). Au Canada, il est estimé que de 170 000 à 201 000 personnes vivent avec cette maladie qui n'est pas mortelle, mais dont les symptômes sont douloureux et débilitants (Wong *et al.* 2007). Un des facteurs importants de la maladie est le déséquilibre du microbiote (Frank *et al.* 2007). Plusieurs études démontrent que les probiotiques aident à diminuer les symptômes de l'IBD (Moayyedi *et al.* 2010; Nikfar *et al.* 2008) et de plusieurs autres maladies inflammatoires comme l'asthme (Yu *et al.* 2010), l'eczéma (Hoang *et al.* 2010) et l'arthrite (So *et al.* 2008). Une diminution de l'inflammation par les probiotiques permettrait de réduire le stress psychologique associé à ces maladies, les effets secondaires reliés au traitement, les coûts et les pertes de productivité.

2. L'intestin

L'intestin fait partie de l'appareil digestif et sert principalement à la digestion et l'absorption des nutriments par l'organisme. Il est divisé en deux parties, c'est-à-dire l'intestin grêle et le colon. L'intestin grêle commence au sphincter pylorique de l'estomac et se termine au début du colon à la valve iléo-cæcale. L'intestin grêle est lui-même divisé en trois parties, soit le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Par ailleurs, la surface de l'intestin grêle est composée de trois couches; la muqueuse, la sous-muqueuse et la couche musculaire. Celle qui est en contact avec la lumière de l'intestin est nommée la muqueuse. Cette dernière est pour sa part divisée en trois couches; l'épithélium, la lamina propria et la muscularis mucosae.

La muqueuse n'est pas semblable partout dans l'intestin. Deux types majeurs existent, la villosité intestinale et les follicules lymphatiques (Neutra *et al.* 2001). La muqueuse de la villosité intestinale prend la forme de doigts de 0.5 à 1.0 mm. Les villosités augmentent grandement la surface et permettent une meilleure absorption. L'épithélium est formé de cellules épithéliales cylindriques simples. Ces cellules sont polarisées et la surface exposée à la lumière de l'intestin présente elle aussi des microvillosités qui augmentent encore plus la surface d'absorption. Plusieurs glandes viennent compléter le tout. Les glandes intestinales produisent le suc intestinal et les glandes duodénales neutralisent l'acidité gastrique avec leur mucus alcalin. Les cellules caliciformes ne forment pas la structure typique des glandes, mais sécrètent la mucine qui deviendra le mucus protecteur tout le long de l'intestin (Tortora & Grabowski 1994).

Les plaques de Peyer sont des follicules lymphatiques agrégés servant à faire un lien entre la muqueuse intestinale et le système immunitaire présent dans l'iléon. Elles sont visibles à l'œil et sont caractérisées par un épaissement ayant une forme plus ou moins ronde de la muqueuse. Cet épaissement s'explique par la présence d'épithélium associé au follicule. Cet épithélium diffère grandement de l'épithélium qui compose le reste de l'intestin puisqu'il ne comporte pas de villosités. L'épithélium associé aux follicules est recouvert lui aussi de cellules épithéliales cylindriques simples, mais diffère par la présence de cellules M ("microfold cells"). Ces cellules n'ont pas les microvillosités typiques des cellules épithéliales cylindriques simples, mais seulement

quelques replis. Elles sont très importantes dans la capture d'antigènes (Hase *et al.* 2005) (voir section 5.3.4).

Les plaques de Peyer font partie du "Gut-associated lymphoid tissue" (GALT). Le GALT se compose de tous les tissus lymphoïdes associés au système digestif. Il est le plus imposant système lymphatique du corps humain, étant donné son exposition permanente à un nombre élevé d'antigènes, de bactéries, de virus, de levures et de toxines (Salminen *et al.* 1998). Le GALT est composé des plaques de Peyer et des follicules lymphoïdes isolés et met en place une infrastructure destinée à gérer tous ces éléments pathogènes. Les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés recrutent un grand nombre de cellules présentatrices d'antigènes et de lymphocytes B et T permettant ainsi une réponse rapide du système immunitaire (Koboziev *et al.* 2010).

Le côlon sert principalement à absorber l'eau qui n'a pas été absorbée par l'intestin grêle et à la préparation des fèces à être évacuées. Il absorbe aussi les sels, certaines vitamines du groupe B et la vitamine K et les acides gras produits par les bactéries (Tortora & Grabowski 1994, pp.857–862) (voir section 4).

L'intestin contient un nombre impressionnant de bactéries dont l'ensemble est désigné par le microbiote et doit les maintenir à l'extérieur de l'organisme pour rester en santé (Luckey 1972). La barrière intestinale est assistée de moyens de défense adaptés à ce travail. La sécrétion de mucines, de défensines et d'IgA dans la lumière de l'intestin, par exemple, maintient l'équilibre en diminuant l'adhésion des bactéries et en empêchant la colonisation (voir section 5.3).

3. L'inflammation

Le terme inflammation provient du mot latin *inflammare* qui signifie "mettre en feu". Le concept était déjà compris à l'époque des Romains puisqu'il est facile de reconnaître ses signes physiologiques; la rougeur, l'enflure, la douleur et la chaleur à l'endroit de la blessure (Celsus 1935). En effet, l'inflammation peut entraîner une augmentation du débit sanguin, un accroissement du métabolisme cellulaire, une vasodilatation, un relâchement de médiateurs solubles, une accumulation pathologique de

fluide hors des tissus et un recrutement de cellules appartenant au système immunitaire (Ferrero-Miliani *et al.* 2007). Ces réactions sont importantes puisqu'elles permettent une mobilisation rapide du système immunitaire en apportant un plus grand nombre de leucocytes aux sites endommagés et en permettant une meilleure mobilité des anticorps et des compléments prévenant ainsi des dommages plus importants (Male 2002). L'inflammation débute localement lorsque des cellules sont soumises à un grand nombre d'agents stressants comme la lumière ultraviolette, les allergènes (Barker *et al.* 1991), les agents pathogènes (Sansonetti 2011) et les dommages cellulaires (Shi *et al.* 2003).

L'inflammation est un processus qui nécessite une supervision étroite puisqu'une inflammation chronique est reliée à plusieurs maladies. Les syndromes de l'IBD, comme son nom l'indique, sont causés par une inflammation anormale qui détruit les tissus et cause des douleurs et une perte d'absorption des nutriments et de l'eau dans l'intestin (Yamamoto-Furusho & Podolsky 2007). L'asthme est caractérisé par un relâchement anormal de nombreux facteurs associés à l'inflammation (Ober & Hoffjan 2006). La réponse du système inflammatoire aux allergènes constitue un facteur important dans l'initiation des crises d'asthme (Baxi & Phipatanakul 2010). L'inflammation fait partie de l'environnement des cancers et régule la croissance des tumeurs, de l'angiogenèse et inhibe l'apoptose (Coussens & Werb 2002). NF- κ B est un facteur important comme voie de signalisation dans l'inflammation et le cancer (Basseres & Baldwin 2006; Mantovani 2010).

3.1. Médiateurs de l'inflammation

Les cellules locales vont sécréter plusieurs médiateurs de l'inflammation pour permettre au système immunitaire de se mobiliser. Le complément sert de support à la réaction immunitaire. Il est composé d'un ensemble de protéines servant à l'opsonisation (van Lookeren Campagne *et al.* 2007), à la lyse cellulaire et il sert aussi de chimioattractant pour les neutrophiles et les macrophages (Ricklin *et al.* 2010).

L'histamine est relâchée principalement par les mastocytes, les basophiles et les plaquettes sanguines lors de réactions allergiques et d'invasions bactériennes (Koo *et al.*

2010; Mannaioni *et al.* 1993; Taylor & Metcalfe 2001). L'histamine induit une phosphorylation des protéines d'adhésion cellulaire causant une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité (Andriopoulou *et al.* 1999). Elle sert aussi de chimioattractant pour certaines cellules du système immunitaire (Buckland *et al.* 2003; Hofstra *et al.* 2003).

Les leucotriènes sont exprimés par les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes. Leucotriène B₄ sert d'agent d'adhésion et chimiotactique pour les phagocytes et leucotriène C₄ et ses dérivés, leucotriènes D₄ et E₄, augmentent la perméabilité vasculaire. Ils sont aussi la cause de la vasoconstriction lors des crises d'asthme (de Caterina & Zampolli 2004).

Les prostaglandines peuvent être produites par toutes les cellules, excepté les érythrocytes. Elles sont produites par les cyclooxygénase-1 (Cox-1) et 2 (Cox-2) à partir d'acides arachidoniques. Ainsi, l'acide arachidonique doit être détaché de la membrane cellulaire par la phospholipase A₂. Les prostaglandines ont plusieurs effets dépendant du tissu ciblé, mais en ce qui concerne l'inflammation, deux caractères sont importants. Ils sont de puissants vasodilatateurs et induisent la fièvre (Miller 2006).

Un autre facteur important dans la réponse inflammatoire est l'IL-1. La famille IL-1 est composée de trois facteurs principaux : IL-1 α , IL-1 β et IL-1Ra. IL-1 α et IL-1 β sont plus ou moins semblables dans leurs effets, mais IL-1 β est la forme la plus exprimée chez la souris, alors que chez l'humain c'est la forme IL-1 α qui est le plus exprimée (Chensue *et al.* 1989). IL-1 est produite majoritairement par les monocytes (Eder 2009). Elle est très fortement inflammatoire et induit la fièvre (Henderson & Goldbach-Mansky 2010). Il suffit de 1 ng/kg pour induire la fièvre et une augmentation de neutrophiles chez l'humain (Tewari *et al.* 1990). C'est l'IL-1 α qui stimule la production de chimioattractant pour attirer les neutrophiles (Fillmore *et al.* 2003). Elle augmente la concentration d'IL-6 et IL-8 dans le sang (Ogilvie *et al.* 1996). Les IL-1 sont reconnus par un des 9 récepteurs de l'IL-1 qui, comme décrit plus bas, induit une translocation du facteur NF- κ B (O'Neill 2008).

L'IL-6 est produite par les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales, les fibroblastes et plusieurs autres types de cellules (Kishikawa *et al.* 2002; Krishnamoorthy *et al.* 2007; Morton & Dongari-Bagtzoglou 1999; Verreck *et al.* 2006). La production d'IL-6 est stimulée par de nombreux facteurs; l'IL-1, les endotoxines bactériennes, les TNF et le PDGF (Zhang *et al.* 1990). IL-6 agit comme une cytokine anti- ou pro- inflammatoire dépendamment de la dose et du tissu (Atreya & Neurath 2008; Bruunsgaard 2005; Xing *et al.* 1998). Lorsqu'elle est surexprimée, elle agit comme cytokine pro-inflammatoire et est associée à un mauvais pronostic chez les patients souffrants du cancer de la prostate (Nakashima *et al.* 2000), du cancer colorectal (Grobewska *et al.* 2008), du cancer du pancréas (Mroczko *et al.* 2010), du cancer du poumon à grandes cellules ("non-small-cells carcinoma") (de Vita *et al.* 1998) et souffrant de la maladie coronarienne chronique (Ikonomidis *et al.* 2008). La production d'IL-6 est induite par NF- κ B (Libermann & Baltimore 1990).

IL-8 est une chimiokine (cytokines chimioattractantes) proinflammatoire exprimée par les monocytes, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales et plusieurs autres tissus (Evani *et al.* 2011; Nagata *et al.* 2011; Wolff *et al.* 1998; Wong *et al.* 2011). Sa fonction principale est de recruter les neutrophiles et de stimuler leur dégranulation. IL-8 est induite par un grand nombre de récepteurs puisque son promoteur contient un site de liaison pour les facteurs de transcription NF- κ B, AP-1, et C-EBP/NF-IL-6 (Brat *et al.* 2005).

TNF- α est sécrété par les macrophages, les monocytes, les neutrophiles, les cellules T, et les cellules NK lorsqu'ils sont stimulés par les lipopolysaccharides (LPS) (Agostini *et al.* 1995; Green *et al.* 1998). TNF- α des effets sur le métabolisme, mais dans ce document nous allons nous concentrer sur son effet sur le système immunitaire (Tracey 1992). TNF active les leucocytes, augmente l'adhérence des neutrophiles et des monocytes à l'endothélium et stimule la production de cytokines proinflammatoires comme IL-6 et IL-8. Il aide aussi à la réparation des tissus en augmentant la prolifération des fibroblastes (Tracey & Cerami 1994). Comme mentionné ci-dessous, la réponse au TNF- α est induite par l'intermédiaire de NF- κ B.

CCL3 est une chimiokine produite par les macrophages (Wolpe *et al.* 1988), les monocytes, les lymphocytes présents dans le sang périphérique (Guan *et al.* 2001) et les cellules épithéliales (Tregoning *et al.* 2010). CCL3 est la nouvelle désignation de la protéine MIP-1 α (Zlotnik & Yoshie 2000). Elle est reconnue par le “chemokine receptor 1” (CKR1) et le “chemokine receptor 5” (CKR5) (Alkhatib *et al.* 1996; Gao *et al.* 1993). Il recrute les neutrophiles polymorphonucléaires (Wolpe *et al.* 1988), les cellules T (Castellino *et al.* 2006), les cellules B, les éosinophiles et les macrophages (Mühl & Dinarello 1997). CCL3 induit les macrophages à produire plusieurs médiateurs de l’inflammation comme TNF- α , l’IL-1 β et l’IL-6 (Fahey *et al.* 1992). CCL3 est lui-même induit par un facteur majeur de l’inflammation, NF- κ B (Rezzonico *et al.* 2001).

3.2. Infection par *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie communément retrouvée dans l’intestin des mammifères et des oiseaux (Dho-Moulin & Fairbrother 1999; Gould 2010). Elle fait partie des bactéries à Gram négatif et la plupart des souches font partie intégrante de la microflore. Elles sont très bien adaptées au système digestif. Elles sont anaérobiques facultatives, se développent de façon optimale à 37° Celsius et ne causent généralement pas de problèmes à l’hôte. Certaines souches possèdent même des caractères probiotiques comme *E. coli* Nissle 1917 (Sherman *et al.* 2005).

E. coli peut acquérir des caractères pathogènes et les souches virulentes possèdent généralement des adhésines différentes des *E. coli* non pathogènes (Cassels & Wolf 1995). Six groupes causant des symptômes chez l’hôte sont maintenant établis dans la nature (Kaper *et al.* 2004):

- *E. coli* entéropathogène (EPEC) : Cause la diarrhée chez les mammifères. Elles adhèrent aux entérocytes en injectant une protéine, la “Translocated Intimin Receptor” (Tir), dans les cellules intestinales. Par la suite, elles utilisent des adhésines nommées intimine pour se lier au Tir (Batchelor *et al.* 2000). Ce procédé détruit les microvillosités. Elles sont faiblement invasives et causent de l’inflammation.

- *E. coli* entérohémorragique (EHEC) : Cause la diarrhée, mais avec présence de sang. Les EHEC utilisent des fimbriaes pour s'attacher à la membrane cellulaire et sont modérément invasives. Le facteur le plus important de leur virulence est la possibilité de produire une toxine Shiga qui entraîne une réaction inflammatoire. Si cette toxine est absorbée, elle peut causer des dangers de mort. La souche très connue O157:H7 fait partie de ce type d'*E. coli*.
- *E. coli* entérotoxigène (ETEC) : La cause principale de la diarrhée dans le monde et est souvent la cause de la diarrhée du voyageur. ETEC utilise des adhésines pour se lier à la membrane cellulaire. La particularité des ETEC est qu'elle sécrète deux toxines, une ne résistant pas à la chaleur, l'entérotoxine LT et une plus petite qui est stable jusqu'à 100° Celsius, l'entérotoxine ST. Elles causent une accumulation d'eau dans la lumière de l'intestin. Les ETEC ne sont pas invasives.
- *E. coli* entéroagréatif (EAEC) : Les EAEC adhèrent aux cellules épithéliales et se protègent par un biofilm. Elles causent la diarrhée, mais ne sont pas invasives. Les EAEC sécrètent de l'hémolysine et des entérotoxines ST.
- *E. coli* entéroinvasif (EIEC) : Comme leur nom l'indique, les EIEC peuvent entrer à l'intérieur des cellules épithéliales grâce à un phagosome. Elles lysent par la suite le phagosome pour avoir un accès direct au cytoplasme. Elle cause beaucoup de fièvre et de diarrhée.
- *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) : Les DAEC causent la diarrhée et sont reconnues par le changement qu'elles causent aux microvillosités. Elles stimulent les cellules à les envelopper d'une grande projection cellulaire.

3.2.1. Lipopolysaccharide

Deux attributs distinctifs sont présents sur les *E. coli* peu importe leur virulence. Ces molécules sont nommées "Pathogen-associated molecular patterns" et sont reconnues par les "Pattern Recognition Receptors" comme les TLR et les récepteurs NOD-like. La flagelline, constituant des organes locomoteurs des bactéries, est reconnue par le TLR-5

et active la production d'IL-8 (Hayashi *et al.* 2001). Les lipopolysaccharides (LPS) sont reconnus par le TLR-4 et stimulent la production d'un nombre important de médiateurs inflammatoires grâce à NF-κB (Tapping *et al.* 2000).

Les LPS sont une composante importante de la membrane extérieure des bactéries à Gram négatif. Elles sont composées, comme leur nom l'indique, d'un domaine hydrophobe nommé lipide A et d'un polysaccharide nommé O-polysaccharide qui sont reliés ensemble par un noyau d'acides aminés et un oligosaccharide. La partie hydrophobe sert à ancrer la molécule à la membrane. Cette partie est souvent conservée d'une espèce à l'autre et lui confère son activité sur le système immunitaire (Raetz 1990).

LPS induit une forte production d'IL-6 et IL-1β (Greenhill *et al.* 2011; Harden *et al.* 2011). LPS peut causer un choc infectieux qui mène à la mort et l'homme y est particulièrement sensible (Krakauer *et al.* 2010; Warren *et al.* 2010)

4. Le microbiote

Le microbiote est l'ensemble des microorganismes présents dans le système digestif. C'est un synonyme aux termes microflore et flore intestinale qui sont maintenant désuets.

Les humains peuvent être comparés à un écosystème. Ils vivent en coexistence avec environ 10^{12} microorganismes sur notre peau et 10^{14} microorganismes à l'intérieur de notre système digestif (Luckey 1972). Pour mettre ce nombre en perspective, il est généralement accepté que le corps soit composé de 10^{13} cellules humaines.

Les individus acquièrent leur microbiote de l'environnement qui les entoure. Les fœtus ne possèdent pas de microorganismes dans leur système digestif, mais ils sont colonisés pendant la naissance (Schwiertz *et al.* 2003). Le microbiote est composé de 500 à 1000 espèces différentes de bactéries, mais il est probable que 30 à 40 espèces dominantes composent 99% de la population totale de ces bactéries (Savage 1977; Sears 2005). Le microbiote mature est composé en grande majorité de bactéries anaérobiques obligatoires et 30% des bactéries sont des *Bacteroides* (Hooper 2004; Salyers 1984). La

difficulté à établir un nombre précis d'espèces provient du fait que certaines espèces ne peuvent pas être cultivées à l'extérieur du corps (Sears 2005).

Il est maintenant clair qu'une relation existe entre les microorganismes composant le microbiote et l'hôte. Les microorganismes présents dans l'intestin produisent des composés absorbables à partir de produits que l'hôte ne peut pas utiliser. Les exemples sont nombreux comme la dégradation des polysaccharides en composés utilisables pour produire de l'énergie et une partie de la vitamine K que l'être humain absorbe est produite par les bactéries (Sears 2005; Shearer & Newman 2008). Le microbiote interagit aussi avec le système immunitaire (Macpherson & Harris 2004) et permet un développement adéquat des vaisseaux sanguins dans l'intestin (Stappenbeck *et al.* 2002).

Un déséquilibre du microbiote va donc avoir un impact important sur le système immunitaire et sur le métabolisme. Des expériences sur les rats axéniques ont démontré qu'ils consomment 18 % plus de nourriture et 33 % plus d'eau que les rats qui ne sont pas maintenus dans un environnement stérile (Wostmann *et al.* 1983). Une expérience sur des souris axéniques a, quant à elle, démontré que la colonisation de l'intestin par des bactéries cause une accumulation de gras et une résistance à l'insuline due à une subite amélioration de l'absorption des monosaccharides (Bäckhed *et al.* 2004). De plus, la détection de bactéries par les TLR permet une meilleure résistance de l'intestin aux blessures (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004).

5. Les probiotiques

Plusieurs exemples de microorganismes utilisés comme source de nourriture sont observés un peu partout dans le monde comme le yogourt, le kéfir et le kombucha. Tous ces produits ne sont pas nécessairement des probiotiques. La démonstration des bienfaits est compliquée par le fait que chaque souche n'induit pas la même réponse chez différentes espèces hôtes et peut-être même chez chaque individu.

L'idée que des microorganismes peuvent améliorer la santé est attribuée au Dr Ilya Ilyich Mechnikov qui, en 1907, publia « Essais optimistes » qui se voulait une publication sur le vieillissement de la population de la France. Le travail du Dr

Mechnikov sur la phagocytose, qui fut récompensé par un prix Nobel en médecine en 1908, lui permit de faire des observations sur la flore microbienne de l'intestin. Il émit l'hypothèse que le vieillissement est causé par des bactéries putréfactives présentes dans l'intestin. Par cette hypothèse, il serait donc possible d'augmenter sa longévité en consommant des bactéries lactiques qui délogent les bactéries néfastes du système digestif. Le Dr Mechnikov basa ses observations sur les membres de peuplades de la Bulgarie et des steppes de la Russie bordant la Mer Noire qui selon lui, vivaient très vieux. Les membres de ces communautés consomment du lait fermenté avec des bactéries lactiques. Le Dr Mechnikov croyait qu'il serait possible d'ensemencer l'intestin avec ces bactéries lactiques qui par la suite changeraient le pH et tueraient les bactéries putréfactives. Le Dr Mechnikov débuta alors à consommer du lait sûr qui était fermenté avec *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (Metchnikov 1907). Malheureusement, Mechnikov n'a pas découvert un élixir de jeunesse. Toutefois, des recherches modernes démontrent que les bactéries auxquelles nous sommes exposés sont des facteurs importants de la maturation du système immunitaire et d'une meilleure santé (Macpherson & Harris 2004).

La première utilisation du terme probiotique est attribuée au chercheur allemand Werner Kollath qui, en 1953, a décrit le terme "Probiotika" comme supplément organique ou inorganique nécessaire pour restaurer la santé des patients souffrants de malnutrition due à une alimentation trop riche en nourriture hautement raffinée (Kollath 1953). C'est l'année suivante que Ferdinand Vergin cibra les bienfaits des microorganismes vivant en symbiose avec l'hôte et l'effet destructeur des antibiotiques sur ces microorganismes. Il définira probiotique en tant que l'opposé des antibiotiques : substances actives essentielles au développement sain de la vie (Vergin 1954). R.B. Parker inclut les microorganismes dans sa définition : organismes ou substances qui contribuent à la balance de la flore intestinale (Parker 1974). L'idée que les probiotiques interagissent avec l'hôte fut avancée par Roy Fuller en 1989 : suppléments de microorganismes qui améliore la santé de l'animal hôte en balançant la flore intestinale (Fuller 1989).

La définition moderne est souvent citée comme celle de l'Organisation Mondiale de la Santé. L'OMS définissait en 2001 les probiotiques comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'administrés en quantités suffisantes, confèrent un bienfait pour la santé de l'hôte (WHO 2001). Ce concept évolue encore et l'inclusion des métabolites produits par ces bactéries dans cette définition pourrait s'avérer nécessaire puisque l'effet des métabolites est une propriété importante des probiotiques (Matar *et al.* 2000; Matar *et al.* 2001).

5.1. Prébiotique

Gibson et Roberfroid décrivent les prébiotiques, en 1995, comme des ingrédients alimentaires non digestibles qui possèdent des effets bénéfiques sur l'hôte en promouvant sélectivement le développement ou encore l'activité d'une bactérie ou d'un nombre limité de bactéries dans le côlon (Gibson & Roberfroid 1995). Plusieurs composés ont été caractérisés, à tort et à travers, dans la littérature et par l'industrie alimentaire comme étant prébiotiques. L'inuline et l'oligofructose sont considérés des prébiotiques, mais l'inclusion des galactooligosaccharides est controversée (Davis *et al.* 2010; Roberfroid 2007). L'effet bifidogénique, qui augmente le nombre de *bifidobacteriums* et de lactobacilles dans l'intestin, est aussi souvent confondu avec prébiotique. Plusieurs prébiotiques sont aussi des facteurs bifidogéniques comme l'inuline et l'oligofructose (Meyer & Stasse-Wolthuis 2009). La chicorée, le topinambour, l'ail et les poireaux sont des aliments riches en prébiotiques (Demigné *et al.* 2008; van Loo *et al.* 1995; Ramnani *et al.* 2010). L'utilisation de probiotiques et de prébiotiques qui peuvent interagir ensemble est désignée synbiotique. L'utilisation de galactooligosaccharides augmente l'effet protecteur de la souche Yakult du *Bifidobacterium breve* contre une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (Lkhagvadorj *et al.* 2010). Il en existe plusieurs exemples comme :

- L'inuline et les *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus* (Frece *et al.* 2009; Ooi *et al.* 2010; Roller *et al.* 2004; Takemura *et al.* 2010).

- L'oligofructose et *Lactobacillus rhamnosus* et *Bifidobacterium lactis* (Roller *et al.* 2007).
- Le galactooligosaccharides et *Bifidobacterium breve* souche Yakult (Lkhagvadorj *et al.* 2010).

5.2. *Lactobacillus helveticus*

Lactobacillus helveticus est utilisé dans plusieurs produits fermentés comme les fromages suisses (Emmental, Comté), les fromages italiens (Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Provolone) et le lait fermenté (Aponte *et al.* 2008; Belletti *et al.* 2009; Bouton *et al.* 1998; Falentin *et al.* 2010; Sun *et al.* 2010). Le nom *helveticus* provient du nom d'une tribu celtique rencontrée par les Romains sur le territoire maintenant connu comme la Suisse; Helvetii. Cette bactérie est homofermentative, elle produit donc principalement de l'acide lactique. Elle ne se développe pas en dessous de 15° Celsius et sa température optimale de croissance se situe entre 40 à 50° Celsius. Elle peut fermenter le glucose, le fructose, le galactose, le mannose, le maltose, le lactose et la dextrine, mais ne fermente pas le mannitol, le sucrose, la salicine, le glycérol, l'inositol, le rhamnose, l'arabinose, le xylose, le raffinose, l'inuline, le sorbitol, l'amygdaline, la cellobiose, le melibiose et le melezitose. Elle ne peut pas se développer dans une concentration de plus de 2% (w/v) de NaCl et ni avec la présence de 2% (w/v) de sel biliaire (Sharpe & Wheater 1957). Cette bactérie est principalement utilisée dans la création des fromages puisqu'elle en adoucit le goût et ajoute une touche de noix et de chêne aux produits fermentés (Drake *et al.* 1996).

L. helveticus est reconnue comme une bactérie possédant l'un des pouvoirs protéolytiques les plus puissants des bactéries lactiques. Elle possède en effet plusieurs gènes codant des enzymes protéolytiques ce qui améliorerait son efficacité (Genay *et al.* 2009). Des tests *in vitro* ont démontré que la souche *L. helveticus* R389 peut survivre à la digestion (Vinderola *et al.* 2005). Elle produit des peptides qui sont potentiellement bioactifs (Matar *et al.* 1996). Le lait fermenté par cette souche ralentit le développement du cancer du sein chez la souris possiblement en diminuant la production d'IL-6 (de Moreno de LeBlanc, Matar, LeBlanc, *et al.* 2005; Rachid *et al.* 2006). Cette bactérie a

également démontré un effet immunoprotecteur contre les infections par les bactéries *Salmonella enteritidis serovar* Typhimurium et *E. coli* O157:H7 (Leblanc *et al.* 2004; Vinderola *et al.* 2007)

5.3. Les mécanismes d'action des probiotiques

Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer l'action des probiotiques (voir la Figure 1). Il est fort probable que chaque souche de probiotique n'utilise que quelques mécanismes figurant dans cette liste. Leur réponse est spécifique à l'hôte et aux pathogènes présents.

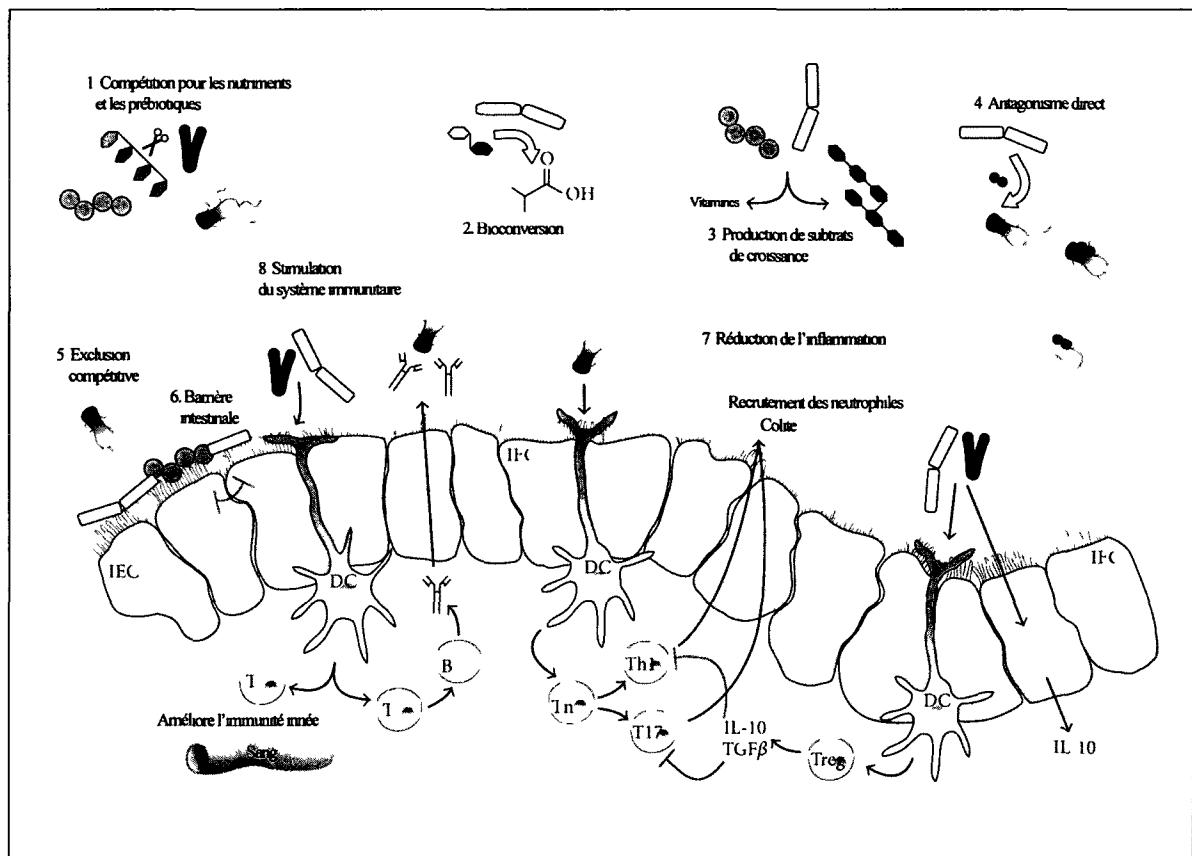


Figure 1 : Résumé des mécanismes d'action des probiotiques dans l'intestin. Figure adaptée sans permission de O'Toole & Cooney, 2008

5.3.1. Concurrence avec les bactéries néfastes

Le premier avantage de la consommation de probiotiques est la concurrence entre les bactéries bénéfiques et les bactéries néfastes.

Le premier mécanisme est la concurrence pour les nutriments et les prébiotiques. Une grande quantité de nourriture se retrouvant dans l'intestin ne peut pas être digérée par l'humain. La lumière intestinale est donc un milieu propice à la croissance de bactéries. Les bactéries commensales ont acquis, au fil de l'évolution, un ensemble impressionnant de gènes leur permettant d'utiliser plus efficacement le grand nombre de nutriments disponibles dans l'intestin (Xu *et al.* 2003). Les probiotiques se nourrissent des mêmes nutriments et réduisent leur disponibilité aux bactéries pathogènes (Lutgendorff *et al.* 2008; Setia *et al.* 2009). L'utilisation de cette réserve de nourriture prévient une éclosion de bactéries pathogènes lors de leur arrivée dans l'intestin réduisant ainsi leur chance de coloniser le milieu.

L'adhésion à la muqueuse intestinale est une propriété importante pour toutes les bactéries intestinales. Chez les bactéries pathogènes, elle facilite la colonisation et leur permet d'envahir les tissus avoisinants (Jenkinson & Lamont 1997; Plant *et al.* 2004). D'un autre côté, l'adhérence à la muqueuse augmente le temps que les probiotiques interagissent avec le système immunitaire et leur permet de moduler sa fonction (Kirjavainen *et al.* 1998). Les souches de probiotiques possédant une grande adhérence permettent une meilleure production d'IgA et les modifications génétiques permettant une meilleure adhérence améliorent l'effet d'une souche peu adhérente (Hsueh *et al.* 2010; Kaila *et al.* 1992). Plusieurs probiotiques font concurrence avec les bactéries pathogènes pour les sites d'adhésions et ils diminuent l'invasion cellulaire par ces dernières (Coconnier *et al.* 1993; Xu *et al.* 2009).

L'étude de l'adhésion *in vivo* est difficile, mais les modèles *in vitro* ont permis d'élucider quelques mécanismes. Certains probiotiques comme le *Bifidobacterium longum* produisent des peptides qui bloquent les récepteurs présents sur les cellules épithéliales qu'utilisent les *E. coli* entérotoxiques (Fujiwara *et al.* 2001). Lazăr *et al.* ont observé des résultats similaires en utilisant le surnageant de *Bifidobacterium breve*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus casei* en même temps que l'inoculation de *E. coli*

entéroagrégitivité, mais ne déloge pas le *E. coli* pathogène si le surnageant est ajouté après l'inoculation. L'ajout du surnageant après la période d'adhésion arrive quand même à réduire la taille et la fréquence des agrégats (Lazăr *et al.* 2009). Lazăr *et al.* théorisent un dialogue croisé « cross-talk » entre les probiotiques et les bactéries pathogènes par les molécules solubles produites par les probiotiques.

Les probiotiques peuvent aussi exprimer des protéines d'adhésion. Les protéines "Mucus-binding protein" sont exprimées par *L. acidophilus* et *L. reuteri* et "Lactobacillus surface protein A" par *Lactobacillus salivarius* permettent l'adhésion au mucus présent à la surface des cellules épithéliales de l'intestin (Buck *et al.* 2005; van Pijkeren *et al.* 2006; Roos & Jonsson 2002). Les protéines de la couche S confèrent l'habilité à certaines souches de probiotiques de se lier aux collagènes et aux lamines présents dans certaines parties de l'intestin (Antikainen *et al.* 2002; Horie *et al.* 2002). Une protéine provenant de la couche S de *L. helveticus* diminue l'adhérence de la souche entérohémorragique *E. coli* O157:H7 sur des cellules épithéliales *in vitro* (Johnson-Henry *et al.* 2007). La couche S de certaines bactéries pathogènes est associée à la virulence de ces bactéries (Sakakibara *et al.* 2007).

Les protéines de la couche S ne sont pas les seuls facteurs permettant l'adhérence aux cellules épithéliales de l'intestin. *Lactobacillus acidophilus* produit la "Fibronectin-binding Protein" et *Lactobacillus reuteri* produit la "Collagen-binding Protein" qui fait partie des "Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules", le même type de protéines utilisé par *Streptococcus* et *Staphylococcus* pour adhérer aux membranes cellulaires (Buck *et al.* 2005; Rivera *et al.* 2007; Roos *et al.* 1996). Les probiotiques réduisent donc les sites d'ancrage disponibles aux bactéries pathogènes.

La coagrégation entre les probiotiques et les bactéries pathogènes est aussi proposée comme mécanisme (Collado, Meriluoto & Salminen 2007a). Plusieurs souches de probiotiques coagrègent avec des bactéries pathogènes et bloquent physiquement les mécanismes utilisés pour lier la membrane cellulaire (Collado, Meriluoto & Salminen 2007b; Kos *et al.* 2003).

Les probiotiques peuvent aussi activement attaquer les autres souches en produisant des composés contre un grand nombre de bactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* et *Shigella* (Gibson & Wang 1994). Ceci se fait principalement par la production de bactériocines ou par la production d'acides. Les bactériocines sont des peptides produits par une espèce de bactéries pour en inhiber la croissance (bactériostatique) ou pour combattre (bactéricide) une autre espèce (Cotter *et al.* 2005; Dykes 1995). Plusieurs espèces de lactobacilles ont aussi la particularité de produire beaucoup de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui inhibe la croissance des autres espèces (Brashears *et al.* 1998; Gilliland & Speck 1975; Ross 1981). *L. helveticus* est une bonne souche productrice de peroxyde d'hydrogène (Yüksekdağ *et al.* 2004). Les bactéries lactiques produisent majoritairement de l'acide lactique, mais aussi de l'acide acétique et propionique (Vandenbergh 1993). La consommation de probiotiques augmente la quantité d'acide acétique et d'acide lactique dans l'intestin et contribue au contrôle des bactéries pathogènes (Grishina *et al.* 2011; Lin *et al.* 2009). L'acide lactique, plus particulièrement, permet de réduire le pH et de perméabiliser la membrane des bactéries Gram négatif augmentant ainsi l'efficacité des composés antibactériens (Alakomi *et al.* 2000). Plusieurs produits utilisés pour la consommation humaine utilisent ces principes comme le fromage et les saucissons (Alegría *et al.* 2010; Castro *et al.* 2011).

Une difficulté importante de la compétitivité est que beaucoup de lactobacilles ne colonisent pas l'intestin. La présence de bactéries probiotiques disparaît quelques semaines après la consommation terminée (Lee *et al.* 2004; Saito *et al.* 2004). La consommation de probiotiques doit donc être maintenue pour profiter de leurs effets bénéfiques. Comme nous le verrons dans une prochaine section, il faut le faire de façon cyclique pour profiter au maximum de leurs effets sur le système immunitaire.

5.3.2. Amélioration de la barrière intestinale

La barrière intestinale est la capacité physiologique des cellules épithéliales de l'intestin (IEC) à interdire le passage du contenu intestinal vers l'intérieur de l'organisme (Baumgart & Dignass 2002). Cette propriété dépend grandement de l'intégrité de la membrane épithéliale et un dommage cellulaire ou une jonction serrée

compromise permet aux microorganismes pathogènes d'envahir l'hôte (Marchiando *et al.* 2011). La jonction serrée est une relation entre les cellules épithéliales composées de protéines transmembranaires incluses dans les membranes des deux cellules (Martin *et al.* 2011). Elle est pratiquement imperméable. Il n'est pas toujours clair comment les probiotiques protègent la barrière intestinale (Eun *et al.* 2011). *Lactobacillus plantarum* augmente l'expression de protéines utilisées dans la jonction serrée (Anderson *et al.* 2010). Les lactobacilles stimulent la production de mucus qui protège les IEC des dommages causés par les produits chimiques et des microorganismes pathogènes (Caballero-Franco *et al.* 2007). Un prétraitement de *Lactobacillus casei* empêche la perte d'intégrité associée à TNF- α et IFN- γ *in vitro* (Eun *et al.* 2011). Plusieurs souches de probiotiques bloquent les dommages causés par des irritants et des produits toxiques (Mennigen & Bruewer 2009; Ueno *et al.* 2011; Zhou *et al.* 2010).

5.3.3. Des cellules épithéliales au système immunitaire

Les bactéries présentes dans le système digestif peuvent interagir de plusieurs façons avec le système immunitaire. Tout d'abord, les premières cellules exposées aux bactéries sont les cellules épithéliales de l'intestin. Les IEC sont polarisées, donc la partie de la membrane exposée à la lumière intestinale est très différente du reste de la membrane. La partie exposée à la lumière de l'intestin s'appelle la surface atypique puisqu'elle présente des microvillosités ce qui est très différent du reste de la surface basolatérale qui est lisse. Les microvillosités vont permettre une plus grande surface pour l'absorption.

Les IEC expriment de TLR-1 à TLR-5 et TLR-9. Pour le moment, seulement TLR-2, TLR-4 et TLR-9 ont été démontrés sur la surface atypique des IEC (Abreu *et al.* 2003). TLR-2 et TLR-4 sont peu exprimés par les IEC de tissus sains pour ne pas induire une inflammation non nécessaire (Otte *et al.* 2004). Cela ne les empêche pas de reconnaître les pathogènes en utilisant les TLR et de produire des signaux inflammatoires comme IL-6 (Miller & McGee 2002; Vinderola *et al.* 2005). Les probiotiques modulent la réponse des IEC aux bactéries pathogènes. *Lactobacillus rhamnosus* GG diminue la production IL-8 produite par les cellules Caco-2 en agissant sur NF- κ B (Zhang *et al.* 2005). *L. helveticus* R389 a stimulé la production de l'IL-6 chez des cellules épithéliales extraites

de l'intestin de souris, mais à un niveau moins élevé qu'une bactérie pathogène. Cette augmentation légère permet la sensibilisation du système immunitaire pour mieux répondre aux maladies. TLR-4 serait partiellement responsable de cette modulation (Vinderola *et al.* 2005).

5.3.4. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques font partie du système immunitaire inné. Elles sont présentes qu'en très petit nombre dans les tissus, mais leur présence augmente dans les tissus exposés à l'environnement. Elles sont de très puissantes cellules présentatrices d'antigène. Les cellules dendritiques ont été longtemps méconnues et ont été d'abord définies selon leur forme. Elles possèdent, lorsqu'elles sont activées, des projections nommées dendrites (Turley *et al.* 2010). Leur fonction générale est d'analyser les composantes de leur environnement et de moduler la réponse immunitaire selon les dangers présents. Elles peuvent induire une réponse inflammatoire ou une tolérance. Ce mécanisme n'est pas encore très bien défini, mais semble être régulé par la présence ou le manque de signaux de danger (Granucci & Ricciardi-Castagnoli 2003).

Chez l'humain, trois familles de cellules dendritiques sont connues. La première famille, les cellules dendritiques myéloïdes (CDm), ressemble beaucoup aux monocytes et stimule une réaction Th-2. La deuxième famille, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp), ressemble aux CDm et produit une grande quantité d'IFN- α . La troisième famille, les cellules dendritiques folliculaires, est présente dans les tissus lymphoïdes secondaires et interagit avec les cellules B pour stimuler et réguler la production d'anticorps lors d'une réexposition à un antigène (Liu 2005).

Les cellules dendritiques d'une même famille peuvent provenir d'un précurseur lymphoïde ou myéloïde. Bien que le fonctionnement se ressemble, les CDp provenant de la lignée myéloïde produisent beaucoup plus d'INF- α que celles provenant de la lignée lymphoïde. Une autre grande difficulté est que chez la souris, la réponse de CDp et CDm semble interchangeable. Les CDp induisent donc une réponse Th-1 et les CDm une réponse Th-2 (Shortman & Liu 2002).

Elles sont d'abord présentes sous une forme immature qui sont capables d'endocytoses, mais ne peuvent stimuler que faiblement la prolifération des cellules T. Ceci s'explique par l'expression faible de CMH de classe II et des co-stimulateurs comme CD40, CD80 et CD86 (Garbi & Hämmerling 2011). Les cellules dendritiques sont en renouvellement constant, des nouvelles cellules arrivent du sang sous la forme de cellules souches CD34⁺, de monocytes ou de cellules dendritiques immatures (Randolph *et al.* 2008). Il semble aussi avoir une interaction entre le CCR6 présent sur les cellules dendritiques et son ligand CCL20, anciennement connu comme MIP-3 α , pour expliquer la localisation constitutive des cellules dendritiques dans les plaques de Peyer (Salazar-Gonzalez *et al.* 2006; Zlotnik & Yoshie 2000).

Dans l'intestin, les cellules dendritiques analysent constamment les bactéries commensales et les pathogènes présents. Selon certaines recherches, différents sous-groupes utilisent différentes manières pour capter les antigènes. La reconnaissance des microorganismes pathogènes s'effectue grâce à des "Pattern Recognition Receptors" comme les "Toll-like Receptors".

Elles peuvent entrer directement en contact avec les antigènes qui se seraient infiltrés dans l'organisme. D'autres vont phagocyter des cellules apoptotiques (Lelouard *et al.* 2010) et certains sous-groupes vont même jusqu'à étendre des dendrites à travers l'épithélium pour sonder l'intérieur de l'intestin (Rescigno *et al.* 2001). Ces dernières dépendent du récepteur de la chimiokine CX₃CR1 (Niess *et al.* 2005). Les cellules associées avec les cellules M présentent le récepteur CCR6 mais non pas le CX₃CR1 (Foti & Ricciardi-Castagnoli 2005). Les cellules dendritiques CX₃CR1 positives ont été retrouvées dans l'iléon, mais pas dans le reste de l'intestin et sans eux le système est plus susceptible aux pathogènes. La présence de bactéries dans l'intestin est nécessaire pour induire les cellules dendritiques à projeter des dendrites dans la lumière de l'intestin (Niess & Adler 2010).

Lorsque la cellule dendritique a phagocyté un antigène, elle perd sa capacité d'endocyter. Elle commence à exprimer des signes de maturité, comme une plus grande expression de CMH de type II et ses co-stimulateurs. Elle va aussi augmenter l'expression de CCR7 (Sallusto *et al.* 1998). Le ligand pour le CCR7 est exprimé sur

l'endothélium des canaux lymphatiques et permet ainsi à la cellule de se déplacer pour se diriger vers les ganglions lymphatiques où elles vont pouvoir stimuler les NK ou les cellules T (Sánchez-Sánchez *et al.* 2006).

Lorsque les cellules dendritiques sont exposées à un pathogène, toute une série d'événements se produit. La réponse des cellules dendritiques semble étroitement liée à l'état du milieu. *In vivo*, l'interaction avec les autres cellules du système immunitaire ou les cellules présentes dans les tissus inflammés pourrait changer la réponse des cellules dendritiques. La réponse est aussi spécifique au pathogène. Lors de tests effectués avec la levure *Candida albicans*, les cellules dendritiques de la souris produisaient de l'IL-12 et induisaient une réponse Th-1. Tandis que, lors de l'exposition à la *Candida albicans* sous forme d'hyphe (filament de plusieurs cellules), il y a une production d'IL-4 et une inhibition de la réponse Th-1 (Romagnoli *et al.* 2004). Cette réponse différente à chaque organisme s'explique par le fait que les cellules dendritiques utilisent plusieurs récepteurs (PRRs) et que dépendamment lesquels de ces récepteurs sont stimulés, la réponse sera spécifique à ce pathogène. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour établir si c'est seulement les TLR qui dictent la réponse de la cellule et si une stimulation de certains TLR spécifiques induit toujours une même réponse, peu importe la provenance du signal.

Une difficulté d'élucider l'action des probiotiques sur les cellules dendritiques est qu'elles sont peu nombreuses et entreprennent facilement une différenciation. Les cellules dendritiques provenant du sang périphérique sont plus faciles à extraire, mais cet avantage est mitigé par le fait qu'elles ne réagissent pas de même façon que les cellules dendritiques associées à l'intestin (O'Mahony *et al.* 2006). Les bactéries probiotiques induisent une production d'IL-10 et d'IL-12 par les cellules dendritiques. La production d'IL-10 induit un effet anti-inflammatoire global. Elle induit la tolérance à un antigène et réduit l'inflammation dans l'intestin grâce aux cellules T régulatrices (Asseman *et al.* 1999). Plusieurs bactéries probiotiques ont démontré une induction de la production d'IL-10 par les cellules dendritiques (Borchers *et al.* 2009). Puisque les probiotiques n'induisent pas beaucoup de signes d'inflammation, les cellules dendritiques sont désensibilisées par un contact prolongé (Hawiger *et al.* 2001).

Les cellules M sont des cellules spécialisées présentes majoritairement dans les plaques de Peyer, mais peuvent aussi être observées dans les villosités (Jang *et al.* 2004). Leurs surfaces atypiques sont formées de petits replis qui peuvent capter les antigènes et les transporter à la membrane basale par transcytose (Neutra *et al.* 1996). La membrane basale des cellules M forme une cavité et est associée aux cellules présentatrices d'antigènes (voir la Figure 2) (Granucci & Ricciardi-Castagnoli 2003). Ceci permet de réduire le temps de passage et facilite le captage des antigènes par des cellules capables de moduler la réponse immunitaire en fonction de l'antigène.

Leur surface atypique est toute désignée pour l'adhésion des microorganismes pathogènes. Elle n'est pas recouverte d'une couche aussi épaisse de glycocalyx que les cellules épithéliales des villosités (Frey *et al.* 1996). Elle présente aussi des récepteurs comme TLR-4 et PAF-R qui permettent une liaison aux bactéries et initialisent la transcytose (Tyrrer *et al.* 2006). Elle contient beaucoup moins de lysosomes ce qui lui permet de transmettre le contenu des vacuoles sans détruire les antigènes (Neutra *et al.* 2001). Dans un état normal, les cellules M exposent que peu d'antigènes et induisent une réponse cellule T CD4+ suppressive, ces cellules produisent TGF- β qui stimule une production d'IgA par les cellules B et réduisent la réponse inflammatoire Th1. Les cellules M seraient donc un deuxième moyen d'exposer les cellules dendritiques aux bactéries probiotiques.

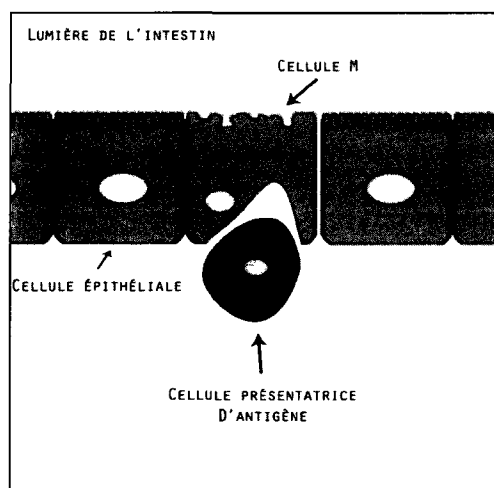


Figure 2 : Physiologie de la membrane épithéliale des plaques de Peyer.

5.3.5. Chimio-prévention

Les bactéries probiotiques peuvent aussi diminuer la charge de molécules toxiques et dommageables pour la santé de l'intestin. La prise de yaourt diminue la concentration des enzymes procancéreuses β -glucuronidase et nitroréductase dans l'intestin et inhibe la progression du cancer de l'intestin (de Moreno de LeBlanc & Perdigon 2004; de Moreno de LeBlanc & Perdigon 2005). Les probiotiques *L. casei* Shirota et *L. acidophilus* ont eu le même effet protecteur, mais pas *L. plantarum* et *L. rhamnosus* (Goldin *et al.* 1980; Goossens *et al.* 2003; Spanhaak *et al.* 1998; Tannock *et al.* 2000). Les bactéries probiotiques peuvent aussi prévenir les dommages causés par les mutagènes en les liants à leurs membranes cellulaires (Rafter 2004).

L'utilisation de lait fermenté par *L. acidophilus*, *L. casei* et *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* chez des rats injectés avec la molécule carcinogène 1,2-Dimethylhydrazine révéla un effet protecteur (Kumar *et al.* 2010). Kumar *et al.* ont attribué cet effet au pouvoir antioxydant de leur mélange (Singh *et al.* 2007).

Un troisième mécanisme réduisant la charge de produit toxique dans l'intestin serait simplement une diminution de la production par le microbiote. Une consommation de *L. acidophilus* et de prébiotiques permet de réduire la production d'ammoniac toxique dans l'intestin et dans l'urine chez l'humain (Wutzke *et al.* 2010).

6. NF- κ B

Tel que décrit dans la revue sur les probiotiques, l'activité bénéfique de la consommation de probiotiques est étroitement liée à son effet sur l'inflammation. Que ce soit en empêchant l'invasion de bactéries pathogènes, en réduisant les symptômes de l'IBD, en limitant les dommages causés par les molécules toxiques ou en modulant la réponse des cellules dendritiques, on peut discerner une tendance à modifier la réponse inflammatoire. Une voie importante dans la signalisation de l'inflammation est le facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- κ B). NF- κ B est activé lors de stress, de dommages oxydatifs, d'irradiations et d'infections. De plus, il est souvent dérégulé et augmente dans les cellules tumorales et les maladies inflammatoires (Bours *et al.* 1994; Mukhopadhyay *et al.* 1995).

Lors de son activation, NF- κ B induit la production de multiples médiateurs de l'inflammation; IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- α . Il agit aussi sur la prolifération cellulaire en agissant sur des facteurs de croissance comme par exemple le vascular endothelial growth factor C (VEGFC) et HIF-1 α (Chilov *et al.* 1997; van Uden *et al.* 2008). Son effet sur la propagation des métastases, quant à elle, est causé par son interaction avec la matrix métallopeptidase 9 (MMP9) et CXCR4 (Helbig *et al.* 2003; Yokoo & Kitamura 1996). Tous ces signaux sont importants pour permettre la survie de l'organisme lors de stress (Chen *et al.* 2003), mais l'activation chronique de NF- κ B entraîne des dangers. NF- κ B est un important facteur antiapoptotique (Huang, DeGuzman, *et al.* 2000) et son inhibition est un mécanisme prometteur pour le traitement des cancers et des maladies inflammatoires (Nishimura *et al.* 2006; Yamamoto & Gaynor 2001).

NF- κ B régularise la prolifération et la survie des cellules en reconnaissant la séquence d'ADN "ATTTGCAT" présente dans plusieurs promoteurs (Staudt *et al.* 1986). Le terme NF- κ B peut être utilisé pour nommer la famille, la sous-famille ou l'hétérodimère p50/p65. Le facteur est composé de deux sous-unités appartenant à la famille NF- κ B. Il existe 5 différentes protéines de la famille NF- κ B chez les mammifères. Ces dernières sont divisées en deux classes, la classe 1 et la classe 2. La classe 1 est d'abord produite sous forme de précurseurs. Les protéines p105 et p100 sont par la suite ubiquitinées et protéolysées sélectivement pour conserver les protéines NF- κ B1 (p50) et NF- κ B2 (p52). La classe 2 est composée de RelA aussi nommée p65, RelB et c-Rel.

NF- κ B fait partie des facteurs de transcription à réaction rapide. Cette terminologie indique que le facteur est déjà présent dans la cellule sous forme inactive. Dans le cas de la voie de signalisation canonique de NF- κ B, le facteur est inhibé par I κ B. I κ B doit être d'abord phosphorylé par la kinase d'I κ B (IKK). L'I κ B est par la suite ubiquitiné et est reconnu par le protéasome pour être détruit (Karin & Lin 2002). Ceci libère le signal de localisation nucléaire présent sur les sous-unités de la classe 2 (Beg *et al.* 1992). Le complexe NF- κ B est donc libre de transloquer au noyau et d'induire les gènes qu'il cible (Pahl 1999) (voir Figure 3). Dans la voie non canonique, la kinase induisant NF- κ B (NIK) cause la phosphorylation du précurseur p100 qui est par la suite réduit en p52 par le protéasome. Le p52 dimérise avec RelB pour former le complexe actif (Hoffmann

et al. 2006). La voie non canonique ne sert pas à induire une réponse inflammatoire et antiapoptotique comme la voie canonique, mais sert plutôt à la différenciation cellulaire (de Jong *et al.* 2010).

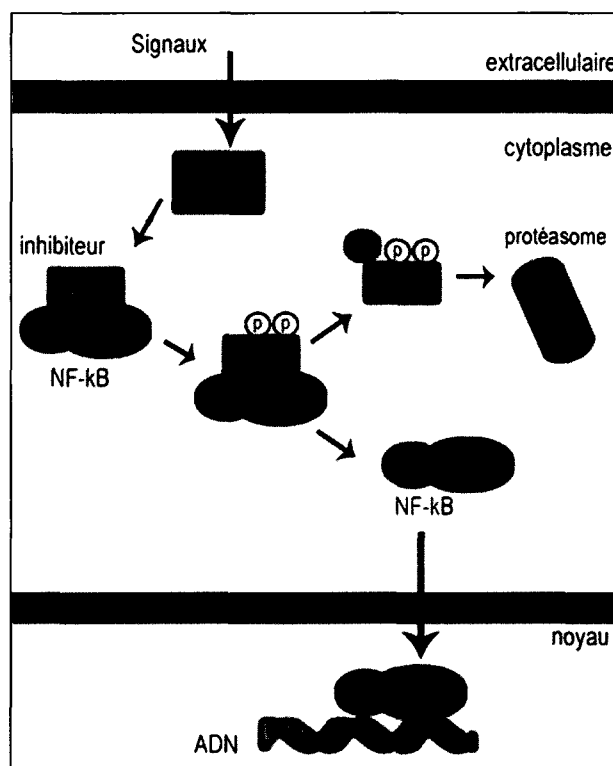


Figure 3 :Résumé du mécanisme d'activation de la voie de signalisation de NF-κB.

6.1. NF-κB de classe 1

La classe 1 est composée des sous-unités p50 et p52. p105, le précurseur de p50, est codé par le gène *NFKB1* situé sur le chromosome 3 de la souris (Ten *et al.* 1992) et sur la bande q24 du chromosome 4 chez l'humain (Le Beau *et al.* 1992). Ce gène code une protéine de 971 acides aminés chez la souris et 968 acides aminés chez l'humain. Le p100 est codé par le gène *NFKB2* situé sur le chromosome 19C3-D2 de la souris (Paxian *et al.* 1999) et sur le chromosome 10 q24 de l'humain (Liptay *et al.* 1992). Les protéines de la classe 1 sont composées d'un domaine d'homologie de Rel (RHD) à l'extrémité N-terminale (Bours *et al.* 1990). Ce domaine peut être divisé en trois parties, c'est-à-dire, la partie N-terminale (NTD), la partie responsable de la dimérisation (Dim) et la partie

responsable de la localisation nucléaire (NLS). Le RHD est donc responsable de la dimérisation avec les autres protéines de NF- κ B, l'interaction avec l'ADN et de la translocation au noyau. Les protéines de la classe 1 comportent un domaine à répétition ankyrine dans l'extrémité C-terminale qui cause leur localisation dans le cytoplasme (Blank *et al.* 1991; Bours *et al.* 1990). Les domaines à répétition ankyrine se retrouvent dans un grand nombre de protéines et sont souvent liés à une interaction membranaire ou une interaction protéine-protéine (Sedgwick & Smerdon 1999) (voir Figure 4).

Le p105 peut être constitutivement dégradé en p50 par le protéasome 26S. Dans ce cas, la région riche en glycine (GGG) servirait à protéger le RHD du protéasome et ainsi créer la protéine p50 (Lin *et al.* 1998; Moorthy *et al.* 2006). Cette protéolyse partielle détruit les sept répétitions ankyrines présentes dans la partie C-terminale de p100 et p105. Ces répétitions s'apparentent à celles retrouvées dans l'I κ B α . Donc, elles serviraient non seulement à empêcher la translocation des précurseurs au noyau, mais aussi à inhiber les autres sous-unités de NF- κ B (Dobrzanski *et al.* 1995; Liou *et al.* 1992). Une seconde voie utilise le "death domain" (DD) pour faciliter la phosphorylation de deux sérines dans la partie C-terminale par l'IKK activée (Heissmeyer *et al.* 2001). Ceci permettrait l'ubiquitination et, par la suite, la dégradation complète par le protéasome. Lorsque le précurseur est détruit, la sous-unité qui lui est liée est libre de servir à la signalisation (Lin *et al.* 1998).

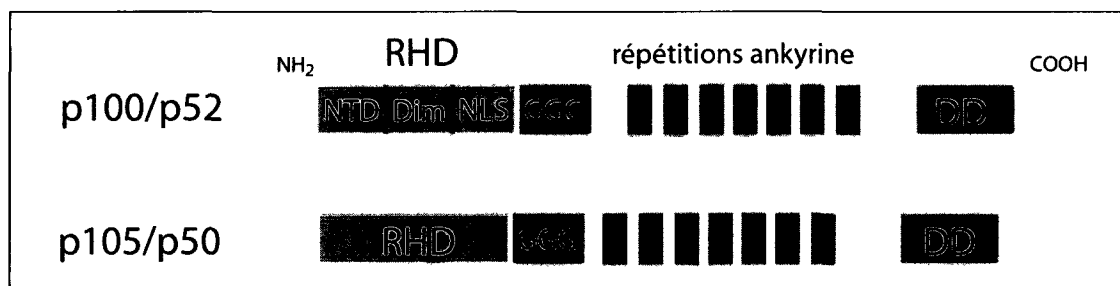


Figure 4 : Structure caractéristique des protéines de la classe 1.

6.2. NF- κ B de classe 2

La classe 2 contient les protéines RelA (p65), RelB et c-Rel codées respectivement par les gènes RelA, RelB et Rel (Wilhelmsen *et al.* 1984). Les protéines de la classe 2 possèdent elles aussi un domaine d'homologie de Rel (Bours *et al.* 1992; Nolan *et al.* 1991). Une différence majeure est qu'elles ne contiennent pas de répétitions ankyrines et n'ont pas besoin d'être clivées pour être actives. Elles contiennent aussi un domaine de transactivation (TAD) à leur partie C-terminale qui n'est pas présent chez la classe 1 (voir Figure 5). Ce domaine confère aux protéines de la classe 2 leur capacité à induire leurs gènes cibles (Bull *et al.* 1990; Schmitz & Baeuerle 1991). Plusieurs sites pouvant être phosphorylés sont présents dans le TAD et influencent alors la localisation et la capacité de NF- κ B à moduler ses gènes cibles (Perkins 2006). Ces différents motifs de phosphorylation pourraient expliquer pourquoi NF- κ B n'influence pas tous les gènes de la même façon et comment la réponse est modulée selon le stimulus (Perkins & Gilmore 2006). RelB diffère puisqu'elle contient une fermeture à glissière à leucine ("leucine zipper") et une modification de ce motif réduit grandement sa capacité à induire ses gènes cibles (Dobrzanski *et al.* 1993). p65 est nécessaire pour la survie des souris puisque les mutants RelA^{-/-} ne parviennent pas à atteindre la fin du cycle de gestation et que c-Rel peut remplacer RelA jusqu'à un certain point (Doi *et al.* 1997; Grossmann *et al.* 1999). Les cellules du foie se dirigent vers l'apoptose et les souris décèdent d'hémorragie (Beg *et al.* 1995). Une augmentation de TNF- α cause les dommages au foie puisque des souris RelA^{-/-} et TNF- α ^{-/-} survivent, mais sont très sensibles aux infections bactériennes. Quant à RelB, elle est nécessaire dans la différenciation des DC (Burkly *et al.* 1995).

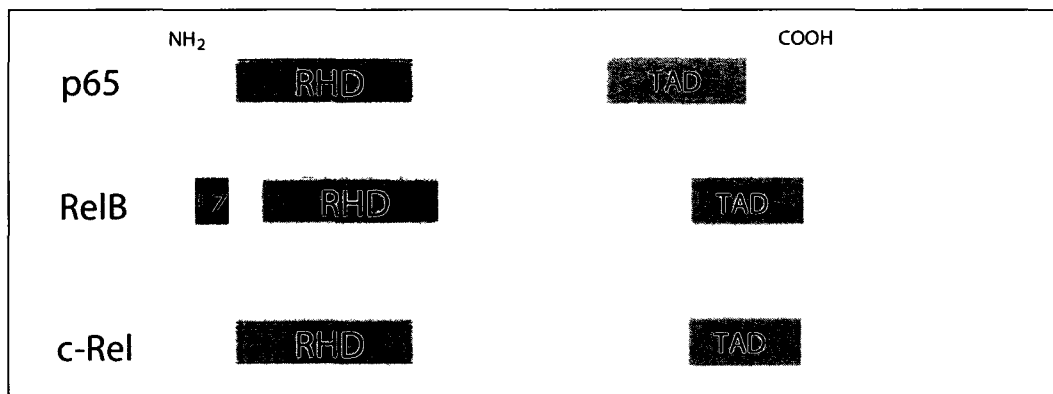


Figure 5 : Structure caractéristique des protéines de la classe 2.

6.3. Inhibition du NF- κ B

L'inhibition du NF- κ B est effectuée par plusieurs protéines. La famille des I κ Bs contient des protéines qui inhibent la majorité des dimères du NF- κ B, mais les deux précurseurs p105 et p100 sont aussi des inhibiteurs (Blank *et al.* 1991). I κ B α et I κ B β sont les inhibiteurs les plus communs.

Les inhibiteurs contiennent tous des répétitions ankyrines nécessaires pour la liaison entre l'inhibiteur et le complexe NF- κ B (voir Figure 6) (Hatada *et al.* 1993). Cette liaison se produit dans la région se situant entre les répétitions ankyrine 1 et 2 et une partie du facteur de localisation nucléaire du p65 (Beg *et al.* 1992). Les répétitions 3 à 5 couvrant le RHD interagissent avec les deux sous-unités. La répétition 6, quant à elle, agit sur la partie N-terminale du domaine de dimérisation du p65 seulement (Huxford *et al.* 1998; Jacobs & Harrison 1998). La répétition 6 et la partie C-terminale d'I κ B α composée d'une région PEST serait la cause principale de l'inhibition par I κ B α de la liaison à l'ADN par le NF- κ B (Ernst *et al.* 1995). La région PEST est une séquence d'acides aminés riche en proline (P), en acide glutamique (E), en sérine (S), et en thréonine (T). Elle est associée aux protéines possédant de courtes durées de vie et servirait à détruire constitutivement I κ B α par calpaïne (Pando & Verma 2000; Rogers *et al.* 1986; Shumway *et al.* 1999).

Tous les inhibiteurs n'interagissent pas de la même manière avec les sous-unités NF- κ B. I κ B α cache seulement le NLS de p65 et laisse le NLS de p50 libre, mais I κ B β ,

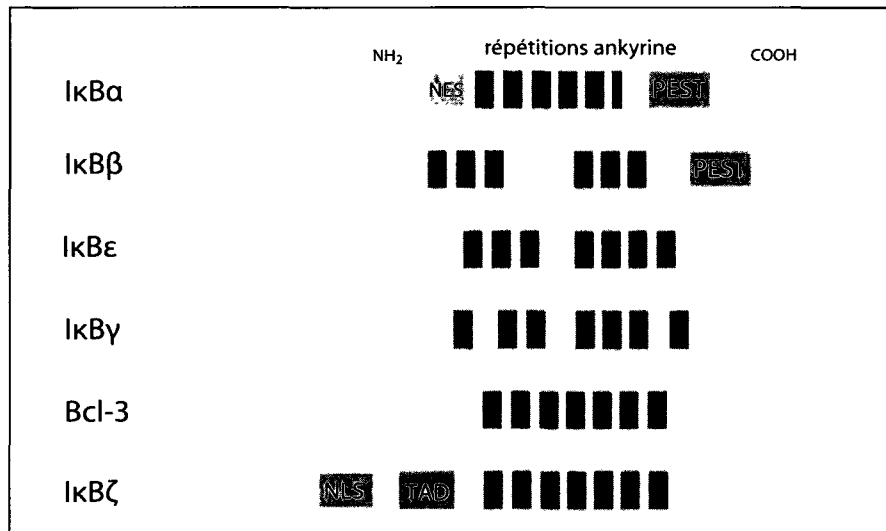


Figure 6 : Structure caractéristique des inhibiteurs de la voie NF- κ B.

6.4. Activation du NF- κ B

Plusieurs stimuli peuvent induire la voie de signalisation de NF- κ B, mais trois différentes familles de récepteurs sont les mieux caractérisées dans l'induction de la voie canonique (voir Figure 7). La voie canonique implique l'utilisation du complexe IKK et plus précisément de la sous-unité kinase d'IκB β (IKK β) pour phosphoryler IκB (Mercurio *et al.* 1997). La voie non canonique, quant à elle, utilise IKK α (Senftleben *et al.* 2001). Les TLR et le récepteur de l'interleukine 1 fonctionnent plus ou moins de la même façon pour effectuer ce travail (voir Figure 8) et le récepteur de TNF- α utilise une voie différente (voir Figure 9).

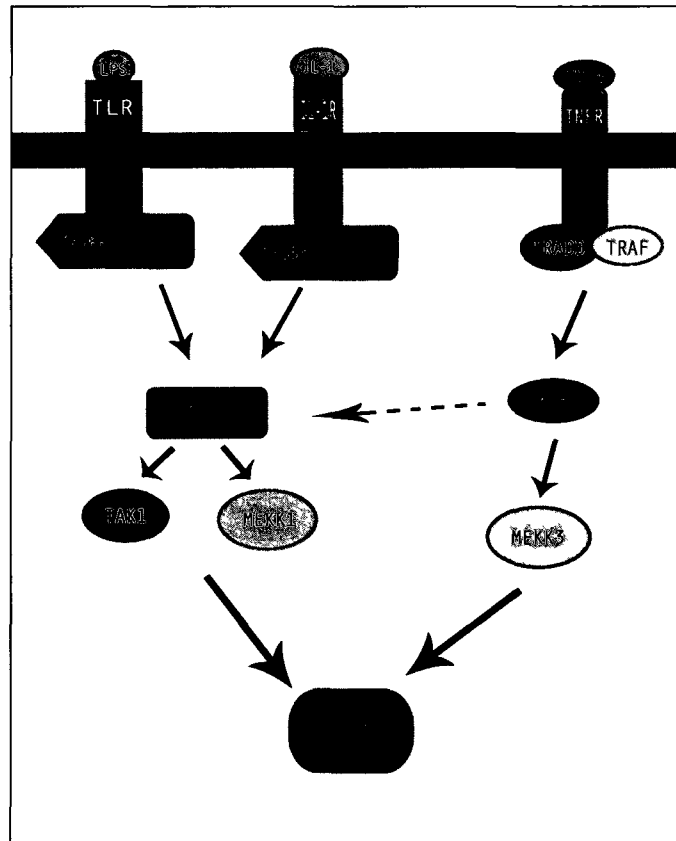


Figure 7 : Récepteurs activant NF- κ B.

6.4.1. La voie induite par la famille des TLR et IL-1R

Les membres de la famille des récepteurs de l'IL-1 et les TLR peuvent induire NF- κ B, mais ne peuvent pas agir directement sur NF- κ B. Pour libérer le complexe NF- κ B, les inhibiteurs doivent être phosphorylés et ubiquitinés, mais ces deux récepteurs ne possèdent pas d'activité de phosphorylation (DiDonato *et al.* 1996). La partie cytoplasmique de ces récepteurs présente une structure appelée "Toll/IL-1R homology domain"(TIR) (Medzhitov *et al.* 1997; Medzhitov *et al.* 1998). Lors de l'activation, TIR recrute, grâce à une interaction TIR-TIR, le "Myeloid Differentiation Primary Response Gene (88)" (MyD88) et le "Toll-Interleukin 1 Receptor Domain Containing Adaptor Protein" (TIRAP) aussi appelé MyD88-adaptor-like (MAL) (Fitzgerald *et al.* 2001).

Deux "IL-1R Associated Kinase" (IRAK), IRAK1 et IRAK4 sont nécessaires pour continuer le processus (Cao, Henzel, *et al.* 1996; Li *et al.* 2002; Muzio *et al.* 1997). "TNF

Receptor Associated Factor 6" (TRAF6) est par la suite recruté par IRAK (Qian *et al.* 2001). TRAF6 va alors composer le "TRAF6-Regulated IKK Activator" 1 et 2 (TRIKA1 et TRIKA2). TRIKA1 est une enzyme de conjugaison d'ubiquitine et est composé de deux protéines, "Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 N" (Ubc13) et "Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 Variant 1"(Uev1A) (Deng *et al.* 2000). TRIKA2 est formé de "TGF-beta-Activated Kinase 1 and MAP3K7-Binding Protein 1" (TAB1), "TGF-beta-Activated Kinase 1 and MAP3K7-Binding Protéine 2" (TAB2) et "TGF-beta Activated Kinase 1" (TAK1) (Ninomiya-Tsuji *et al.* 1999; Shibuya *et al.* 1996; Wang, Deng, *et al.* 2001). TRIKA1 et 2 nécessitent une ubiquitination pour être actifs (Deng *et al.* 2000; Wang, Deng, *et al.* 2001). Ceci laisse croire que TRAF6 serait une ubiquitine ligase (E3) puisqu'elle contient un domaine RING N-terminal retrouvé sur un grand nombre d'ubiquitine ligase (Cao, Xiong, *et al.* 1996; Lorick *et al.* 1999). TAK1 phosphorylerait IKK β (Takaesu *et al.* 2001).

TRAF6 peut aussi recruter le "Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll Pathways" (ECSIT) qui lui permet de modifier "Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1" (MEKK1) (Kopp *et al.* 1999; Lee *et al.* 1997). MEKK1 va par la suite phosphoryler IKK α et IKK β ou initier la voie AP-1 grâce à MKK4 (Dérijard *et al.* 1995; Lee *et al.* 1998; Xia *et al.* 1998). MEKK3, plus souvent lié à la voie de TNF- α , a aussi été démontré à interagir avec TRAF6, mais cette interaction n'est pas encore très bien définie (Huang *et al.* 2004).

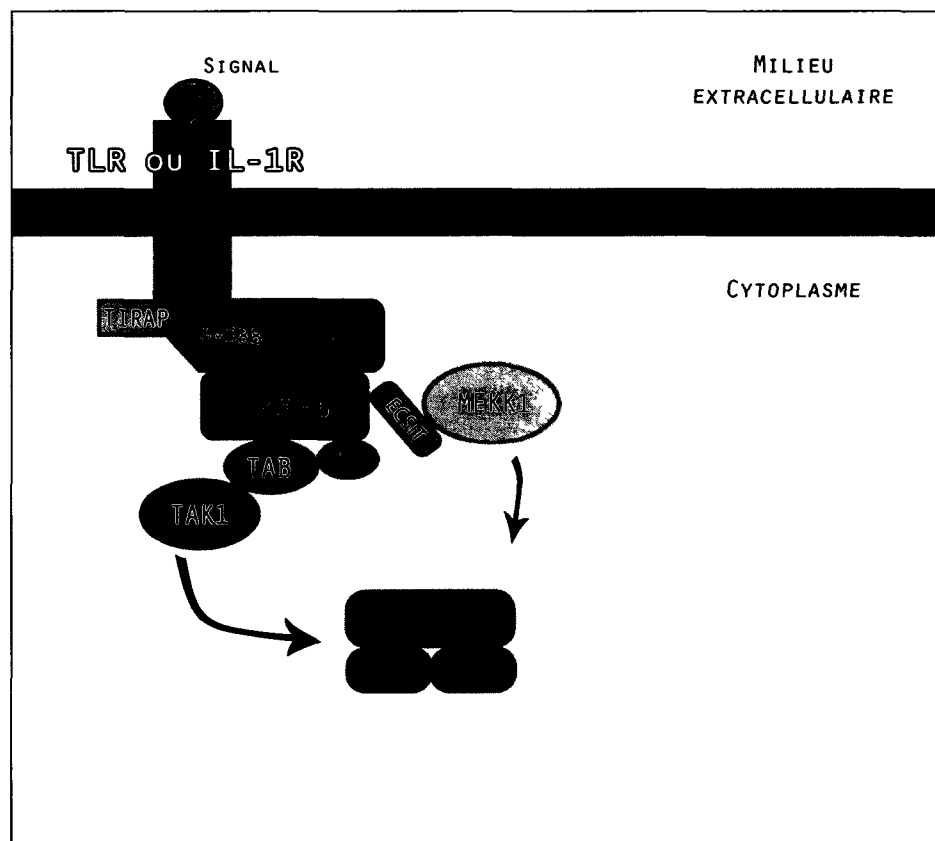


Figure 8 : Mécanisme d'activation de la voie NF- κ B par les TLR.

6.4.2. La voie canonique induite par la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale.

La famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFR) agit différemment que celle des TLR et de IL-1R. Premièrement, certains récepteurs de la famille TNFR vont agir sur la voie canonique et certains, comme BAFF-R, vont agir à la fois sur les voies canoniques et non canoniques de NF- κ B (Hayden & Ghosh 2008; Mackay & Schneider 2009). Voici, en premier, le mécanisme d'action pour la voie canonique. Comme TLR et IL-1R, TNF- α ne possède pas d'activité enzymatique et elle doit recruter des adaptateurs pour agir sur NF- κ B. Pour se faire, TNFR utilise le "Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein" (TRADD) (Hsu *et al.* 1995; Jiang *et al.* 1999). TRADD recrute TRAF2, TRAF5 et le "Receptor Interaction Protein 1" (RIP1) (Au & Yeh 2007; Hsu *et al.* 1996; Takeuchi *et al.* 1996). Finalement RIP1 recrute

MEKK3 et le complexe TAK1/TAB1/2/3 (Blonska *et al.* 2005; Yang *et al.* 2001). TAK1 phosphoryle IKK α et IKK β . MEKK3 phosphoryle IKK γ (Yao *et al.* 2007). Il aurait possiblement une interaction entre certains membres de la famille TNFR et TRAF6 (Darnay *et al.* 2007; Hostager 2007).

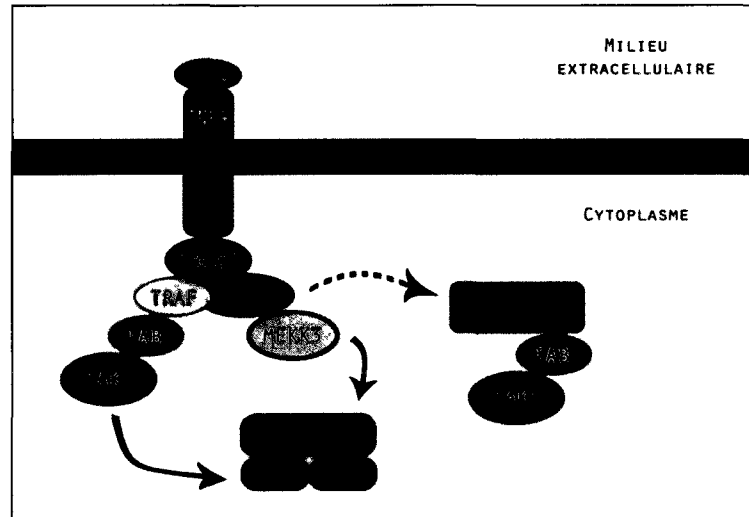


Figure 9 : Mécanisme d'activation de la voie NF- κ B par le récepteur de TNF- α .

6.4.3. La voie non canonique induite par certains TNFR.

Comme mentionnés ci-dessus, certains récepteurs membres de la famille TNFR peuvent induire la voie non canonique. Ceux-ci sont : BAFF-R (Tnfrsf13c), RANK (Tnfrsf11a), CD40 (Tnfrsf5), Lymphotoxin-beta receptor (Tnfrsf3) (Anderson *et al.* 1997; Ishida *et al.* 1996; Mackay & Schneider 2009; Nakano *et al.* 1996). La voie non canonique diffère de la voie canonique puisqu'elle sert à la prolifération cellulaire, au fonctionnement des cellules B et elle est reliée aux tissus lymphoïdes (Droebner *et al.* 2010; Franzoso *et al.* 1998; Ishikawa *et al.* 1997; Mackay *et al.* 1999). Le précurseur p105 est en majorité constitutivement dégradé en p50 (voir section 2.1), mais le processus doit être induit dans le cas du p100 (Xiao *et al.* 2001). Si p50/p65 se retrouve dans presque tous les types cellulaires, il n'en est pas le cas pour p52, bien que son précurseur p100 soit présent. Une autre différence majeure est que seulement IKK α est nécessaire pour induire la voie non canonique (Dejardin *et al.* 2002). Le mécanisme de la

voie non canonique est encore moins bien connu que la voie canonique, mais il semble que lorsque le récepteur lie son ligand, TRAF3 serait séquestré, inactivé ou détruit (voir Figure 10) (Liao *et al.* 2004). TRAF3 possède un site de liaison pour NIK et le site de liaison pour TRAF3 se situe sur la partie N-terminale de NIK (Keats *et al.* 2007; Liao *et al.* 2004). Cette interaction permet à TRAF3 de lier et ubiquitiner constitutivement NIK et causer sa dégradation dans les cellules au repos (Keats *et al.* 2007; Liao *et al.* 2004). Lorsque le TRAF3 est inactivé, NIK s'accumule et peut activer IKK α (Xiao *et al.* 2001). IKK α seule ne possède pas une forte affinité pour p100 et NIK est nécessaire pour une liaison adéquate (Xiao *et al.* 2004).

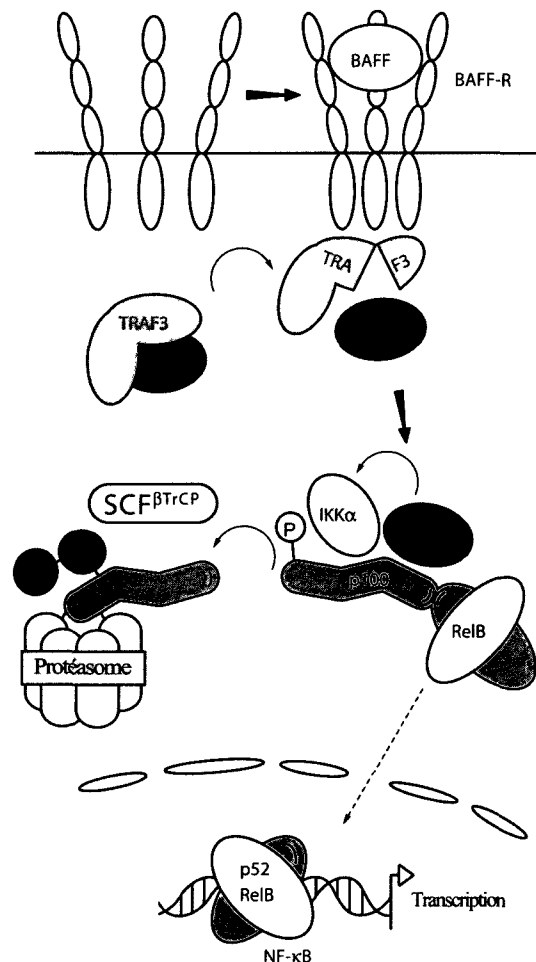


Figure 10 : Mécanisme d'activation de la voie non canonique de NF- κ B par le récepteur BAFF. Figure tirée et modifiée sans autorisation de Hacker & Karin, 2006.

6.4.4. Les autres voies.

Plusieurs autres systèmes peuvent induire NF- κ B. Les récepteurs des cellules T et B utilisent des “Protein Kinase C” pour agir sur la “Caspase recruitment domain-containing protein 10” (CARD10), CARD11, CARD14, BCL10 et la “Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1” (MALT1) (Bertin *et al.* 2001; Wang, Guo, *et al.* 2001). CARD11 serait la plus importante des CARD (Pomerantz *et al.* 2002). CARD11 sert d'échafaudage pour bâtir un complexe composé de BCL10, TRAF6, TAK1, caspase-8, et IKK γ nécessaire à l'activation de IKK (McCully & Pomerantz 2008).

Le mécanisme qui induit la voie NF- κ B par le dommage à l'ADN n'est pas encore très bien compris, mais certaines étapes ont été définies. Une étape utilise “p53-inducible Death-Domain-Containing Protein” (PIDD) pour agir sur RIP1 et IKK γ (Janssens *et al.* 2005). IKK γ serait modifiée par “Small Ubiquitin-like Modifier” (SUMO) (Huang *et al.* 2003). L'autre mécanisme utilise “Ataxia telangiectasia mutated” (ATM) pour amorcer un mouvement de navette entre le noyau et le cytoplasme de IKK γ . Un hétérotrimère Mre11/RAD50/NBS1 recrute ATM à l'endroit du dommage et le phosphoryle (Falck *et al.* 2005). Par la suite, ATM phosphoryle IKK γ activant ainsi NF- κ B (Huang *et al.* 2003; Wu *et al.* 2006).

6.5. Le complexe IKK

Au centre de la voie de signalisation NF- κ B réside le complexe IKK. Il est composé de 2 kinases ayant des effets sur les I κ Bs et d'une sous-unité régulatrice. Le nombre de chaque sous-unité comprise dans le complexe n'a pas encore été résolu probablement dû à une composition différente selon les voies nécessaires à activer (Solt *et al.* 2007). La première sous-unité régulatrice est nommée “Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha” (IKK α) ou “Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase” (CHUK) (Chen *et al.* 1996; DiDonato *et al.* 1997; Mock *et al.* 1995). La seconde sous-unité est IKK β aussi nommée I κ BKB (Mercurio *et al.* 1997; Woronicz *et al.* 1997). La sous-unité régulatrice est nommée IKK γ ou “NF-kappa-B essential modulator” (NEMO) (Rothwarf *et al.* 1998; Yamaoka *et al.* 1998). IKK α et IKK β possèdent beaucoup de similarités (52 % de leurs peptides) et leur kinase possède une similarité encore plus grande (65 %) (Zandi *et al.* 1997). Leur partie N-Terminale possède le

domaine kinase (KD) et une fermeture à glissière à leucine (LZ). La partie C-terminale possède une structure hélice-boucle-hélice (HLH) et le domaine de liaison à IKK γ (NBD) (Connelly & Marcu 1995; Kuno *et al.* 1995; Rothwarf *et al.* 1998; Zandi *et al.* 1997). La région LZ permet aux deux sous-unités de se dimériser (Zandi *et al.* 1997). IKK γ contient deux domaines coil-coiled, CC1 et CC2, dans la partie N-terminale, un domaine LZ et un domaine doigt de zinc (ZF) dans la partie C-terminale (Rothwarf *et al.* 1998; Rushe *et al.* 2008; Yamaoka *et al.* 1998). Le site d'interaction entre IKK γ et les sous-unités kinase se trouve dans la partie N-terminale, mais CC2 et le domaine LZ pourraient permettre des complexes plus grands en interagissant sur plusieurs protéines (voir Figure 11) (Agou *et al.* 2002; May *et al.* 2000; Rushe *et al.* 2008; Tegethoff *et al.* 2003).

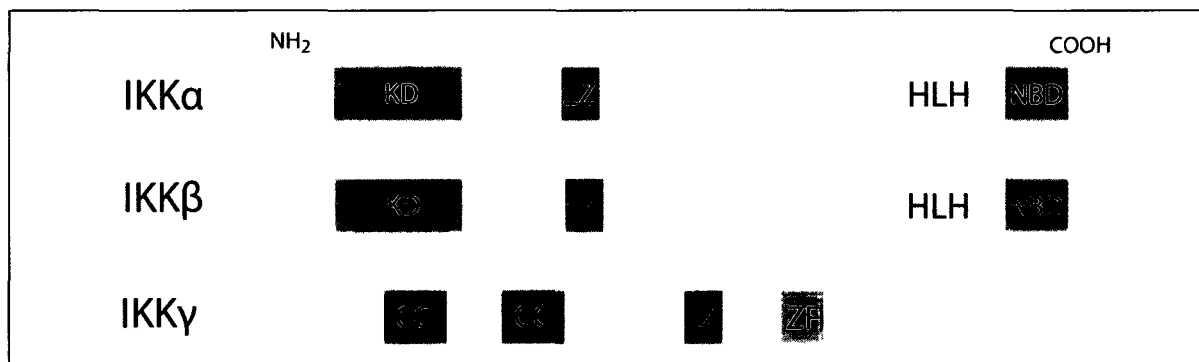


Figure 11 : Structure caractéristique des kinases d'I κ B.

7. Hypothèse de recherche et objectifs

Les probiotiques sont de plus en plus utilisés pour leurs bienfaits sur la santé, mais les mécanismes d'action sont encore mal compris. Leurs effets sur un grand nombre de maladies inflammatoires sont liés à l'effet immunomodulateur et plus précisément leurs effets sur l'immunosurveillance. Riedel *et al.* ont rapporté une absence de translocation de NF- κ B lors de tests utilisant différentes bifidobactéries sur des cellules HT-29 (Riedel *et al.* 2006), mais Pagnini *et al.* ont pu observer, en utilisant des IEC fraîchement isolées, une translocation de la sous-unité p65 de NF- κ B et une diminution de l'inhibiteur I κ B α (Pagnini *et al.* 2010). Deux causes peuvent expliquer ces différences. L'une d'elle est que des lignées cellulaires immortelles ne réagissent pas exactement comme les lignées primaires. Ceci est particulièrement important dans l'intestin où un grand nombre d'échanges avec le milieu, le contact avec le microbiote et l'interaction avec le système immunitaire peuvent changer les voies de signalisation induites par la présence des probiotiques. Un deuxième facteur est que la réponse peut être spécifique à la souche. Il est donc important de vérifier l'effet de notre souche sur la voie de signalisation inflammatoire NF- κ B.

Vinderola *et al.* grâce à leur travail sur les cellules épithéliales de l'intestin ont émis l'hypothèse que le probiotique *L. helveticus* R389 module la réponse immunitaire en interagissant avec TLR-4 (Vinderola *et al.* 2005). Puisque TLR-4 influence directement l'activité de NF- κ B et que NF- κ B joue un rôle déterminant dans la réponse inflammatoire lors des carcinomes mammaires ou des infections par *E. coli* provoqués chez la souris, il a été opportun de bien clarifier le lien entre l'initiation de la réponse immune au niveau des IECs et la signalisation par NF- κ B. Le but de ce projet était de vérifier si la consommation de *L. helveticus* R389 modifie la translocation de NF- κ B au noyau des cellules épithéliales de l'intestin.

Pour confirmer notre hypothèse nous avons fixé les objectifs suivants :

1. Étudier l'effet de la consommation de lait fermenté grâce à *L. helveticus* R389 sur la voie de signalisation de NF- κ B dans les cellules intestinales des souris Balb/c femelle *in vivo*.

2. Vérifier *ex vivo* la capacité de *L. helveticus* R389 de moduler la réponse inflammatoire des cellules épithéliales intestinales suite à une provocation par *E. coli*.
3. Établir le profil d'expression des gènes induit par la consommation de *L. helveticus* R389.

8. Résultats expérimentaux

Title :Modulation of NF- κ B sub-units by the probiotic *Lactobacillus helveticus* R389.

Authors

Jean-François Mallet^{1,2}, Jairo Duarte¹, Chantal Matar¹

Affiliation

¹Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences, University of Ottawa, Ottawa, Canada.

² Département de chimie et biochimie, Université de Moncton, Moncton, Canada

Running title: Modulation of NF- κ B by *L. helveticus* R389

Key words

Probiotic, NF- κ B, *Lactobacillus helveticus* R389, immunomodulating, Ccl3, inflammatory response

Address for correspondence

Chantal Matar, PhD
Department of Nutrition
Faculty of Health Sciences
University of Ottawa
R2057 Roger Guindon Hall
451 Smyth Road
Ottawa, ON, Canada K1H 8M5
Email: Chantal.Matar@uottawa.ca
Phone: 613-562-5800 ext.8322
Fax: 613-562-5437

Abstract

The use of probiotics is a promising approach in the treatment of inflammatory disease like Crohn's disease and ulcerative colitis. In this experiment, we verified the translocation of NF- κ B *in vivo* in Balb/c mice fed for 2, 5 and 7 days with milk fermented with *Lactobacillus helveticus* R389. No significant changes were noted independently of our previous work on the effect of *L. helveticus* R389 on IL-6 production by IEC. To determine how the probiotic *L. helveticus* R389 modulates the small intestine epithelial cell response, cells extracted from the small intestine of mice fed for 7 days with the fermented milk were exposed to *E. coli* and LPS in an *ex vivo* cell culture. *L. helveticus* R389 successfully prevented the translocation of the p65 and p50 sub-units of NF- κ B returning them to control level. A diminution of the inflammatory signals IL-6 and CCL3 in the supernatant was also observed. These results demonstrate the implication of NF- κ B in the control of the immune response by the consumption of the probiotic *L. helveticus* and could serve as a good complementary treatment to prevent abnormal inflammation in the gastrointestinal tract.

Résumé

L'utilisation des probiotiques est une approche pleine de promesses dans le traitement des maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique. Dans cette expérience, nous avons vérifié *in vivo* la translocation de NF- κ B chez des souris Balb/c nourries pendant 2,5 et 7 jours avec du lait fermenté par *Lactobacillus helveticus* R389. Aucun changement significatif n'a été noté contrairement aux travaux précédents effectués sur la production d'IL-6 par les IEC *ex vivo*. Pour déterminer comment le probiotique *L. helveticus* R389 module la réponse des IEC du petit intestin, des cellules extraites de souris nourries pendant 7 jours avec le lait fermenté furent exposées à la bactérie *E. coli* et à un contrôle positif, LPS, pendant une culture cellulaire *ex vivo*. *L. helveticus* R389 a réussi à prévenir la translocation des sous-unités p65 et p50 de NF- κ B et les conserva au même niveau que le contrôle. La diminution des signaux inflammatoires IL-6 et CCL3 dans le surnageant a aussi été observée. Ces résultats démontrent que la consommation de lait fermenté par le probiotique *L. helveticus* R389 peut protéger contre l'inflammation causée par *E. coli* et pourrait servir de traitement complémentaire pour prévenir l'inflammation anormale dans le tractus gastro-intestinal.

Introduction

Probiotics have known benefits for the host. They prevent and reduce the symptoms of diarrhea (Cremonini *et al.* 2002), and lactose intolerance (He *et al.* 2008). In addition, numerous studies demonstrate that probiotics help manage the symptoms caused by irritable bowel disease (IBD) (Moayyedi *et al.* 2010; Nikfar *et al.* 2008) and may also have an impact on inflammatory disease (Hoang *et al.* 2010; So *et al.* 2008; Yu *et al.* 2010), including the prevention of many cancers (Linsalata *et al.* 2010; Ma *et al.* 2010; Rachid *et al.* 2006). Many mechanisms on how probiotics influence health have been described. They displace potentially pathogenic microorganisms (Wine *et al.* 2009), enhance the innate immunity, help against infection (Vinderola *et al.* 2007), protect against infection by stimulating the production of secretory IgA (Leblanc *et al.* 2004), compete for food with pathogens (Sonnenburg *et al.* 2006), preserve gut barrier integrity (Luyer *et al.* 2005) and modulate the immune response by expressing mediators and pro- or anti-inflammatory cytokines (de Moreno de LeBlanc *et al.* 2006).

Many molecular and cellular pathways involved in the immunoprotection by probiotics have been extensively studied in cellular cultures as well as in animal studies (van Baarlen *et al.* 2010; Ng *et al.* 2009). Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) is among the pathways that have been targeted in *in vitro* studies, illustrating well the impact of probiotics on the prevention of inflammation (Riedel *et al.* 2006). Indeed, NF- κ B is an important pathway in inflammation and cancer (Basseres & Baldwin 2006; Mantovani 2010). NF- κ B is normally retained in the cytoplasm and just needs to translocate to the nucleus to induce a response. This property permits a fast response when cells are facing stress. The translocation of NF- κ B is induced by many signs of inflammation and infection like IL-1, Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), bacterial and viral antigens through the Toll-like receptors (TLR). TLR are primitive pattern recognition receptors that can recognize specific microbial molecules like lipopolysaccharide (LPS) (Poltorak *et al.* 1998). LPS, an important constituent of the cell membrane of Gram-negative bacteria, induced NF- κ B and IL-6 in Intestinal Epithelial Cells (IEC) (Meyer *et al.* 1994; de Plaen *et al.* 2000; Sen & Baltimore 1986).

NF- κ B can be composed of many different subunits from the Rel family containing class 1 proteins NF κ B1 (p50), NF κ B2 (p52) and class 2 proteins RelA (p65), RelB and c-Rel. In the canonical pathway a heterodimer of p50 and p65 is prevented from translocating to the cytoplasm by one of the I κ B family of proteins (Baeuerle & Baltimore 1988). The I κ Bs work by masking the nuclear localization sequence present on the p65 subunit (Beg *et al.* 1992). Once the cells are stimulated, the IKK phosphorylate I κ B. I κ B is then ubiquitinated and degraded by the proteasome. Even if many heterodimers and homodimers have been observed (Ganchi *et al.* 1993), many studies use reporter genes built for the RelA/P50 heterodimer since they are expressed in a large number of cell types (Li & Verma 2002) and are the most important inducible form (Baeuerle & Baltimore 1989). NF- κ B induced the production of multiple signals associated with inflammation; IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α . It also influences cell proliferation and transcription factors; vascular endothelial growth factor C (VEGFC), HIF-1 α (Chilov *et al.* 1997; van Uden *et al.* 2008) and metastasis; MMP9 and CXCR4 (Helbig *et al.* 2003; Yokoo & Kitamura 1996). NF- κ B indirectly promotes cell proliferation, angiogenesis, metastasis and inhibits apoptosis using all these signals, and many others (Huang, DeGuzman, *et al.* 2000).

For this work, we used a lactobacillus strain whose immunomodulating capacity had been previously studied in a murine model, *Lactobacillus helveticus* R389 (Matar *et al.* 2001). It was demonstrated before that probiotics can modulate cytokines *in vivo* in a tumoral mouse model (de Moreno de LeBlanc, Matar, Thériault, *et al.* 2005) and *ex vivo* in IEC (Vinderola *et al.* 2005). They also slow down the progress of mammary tumors (de Moreno de LeBlanc *et al.* 2006; Rachid *et al.* 2006). It was postulated that this phenomenon was initiated and regulated in part by TLR. The translocation of two NF- κ B subunits and the accumulation of two inflammatory cytokines were measured in an *ex vivo* mouse intestinal epithelial cells model. We aimed to study the NF- κ B response in IEC of mice fed with *L. helveticus* R389 and its effect on down regulation inflammatory of response in IEC challenged with LPS and *E. coli*.

Materials and methods

Bacterial cultures

Overnight cultures (37°C; aerobic conditions) of *L. helveticus* R389, isolated from Swiss cheese, were obtained in Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth (Difco, Becton Dickson and Company, Sparks, MD). These inoculums were used to seed (2% v/v) rehydrated non-fat, dried, low-heat grade milk (12% m/v) without added vitamins A and D (Dairytown Products Ltd., Sussex, NB, Canada). The process was repeated using the fermented milk as the inoculums to obtain the milk that was fed to the mice. *Escherichia coli* MM294, a nonpathogenic human isolate, was also used in this study. The strain was isolated, identified, and kindly provided by the Department of Biology of the University of Moncton. Overnight cultures (37°C; aerobic conditions) of *E. coli* MM294 were obtained in Luria-Bertani broth (Difco). The *E. coli* was then heat-inactivated before use (100°C for 10 min.).

Animals and feeding procedures

For this work, 6- to 8-week-old old BALB/c female mice weighing 20 to 25 g from Charles River (Montreal, Canada) were separated into experimental groups. Each experimental group consisted of two mice housed together in plastic cages that were kept in a controlled atmosphere (temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$; humidity $55 \pm 2\%$) with a 12 h light/dark cycle. All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the Animal Care and Veterinary Service of the University of Ottawa.

Animals were given fermented milk *ad libitum* for 7 consecutive days (in replacement of water). All groups of mice simultaneously received a conventional balanced diet *ad libitum*. At the end of each feeding period, animals were anesthetized and euthanized by cervical dislocation to obtain the different tissues for immunological studies.

Primary culture of mouse small intestine epithelial cells.

Preparation of primary cultures of small intestine epithelial cells was performed as described previously (Vinderola *et al.* 2005). In short, at the end of each period of feeding, animals were anesthetized and euthanized by cervical dislocation. The small intestines were collected and kept in Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) containing 2% glucose (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin (Sigma-Aldrich), and 0.1 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). The intestines were flushed six times with 10 ml of the same buffer, opened longitudinally, cut into 2- to 3-mm fragments and digested in 20 ml of HBSS containing 300 U/ml collagenase (Sigma-Aldrich) and 0.1 mg/ml dispase (Gibco, Grand Island, NY, USA) at room temperature for 40 min with a slow agitation. Digestion was stopped by the addition of 20 ml of Dulbecco's modified Eagle medium without phenol red (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (ATCC, Manassas, VA, USA), 10 ng/ml epidermal growth factor (U.S. Biological, Swampscott, Mass.), 2.50 µg/ml insulin, 0.55 µg/ml transferrin, 1.68 pg/ml selenium-A from a 100x ready-to-use solution (Gibco), 100 U/ml penicillin (Sigma-Aldrich), and 0.1 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich).

The solution was left undisturbed for 2 min to let the large fragments settle at the bottom of the flask. The pellet was washed twice with the culture medium and finally resuspended in the same culture medium at a concentration of 1×10^6 organoids (single cells or IEC clusters)/ml. IEC suspensions were then transferred to 96-well cell culture plates (200 µl/well) and challenged with 0.1 µg/ml LPS or 10^7 cells/ml of *E. coli* MM294 for 8 h (37°C; 5% CO₂).

An *in vitro* toxicology assay kit, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) based (Sigma-Aldrich), and trypan blue (0.4%) exclusion were used to assess cell viability. Supernatants were recovered for cytokine determination. IL-6 was determined using the corresponding mouse IL-6 enzyme-linked immunosorbent assay set (BD OptEIA; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). CCL3 was determined using the Mouse CCL3/MIP-1 alpha Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Cells were kept on ice and immediately processed for western blot or snap frozen for RNA extraction.

Western blot

Nuclear and cytoplasmic proteins were obtained using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) following the manufacturer protocol. Nuclear and cytoplasmic extracts were kept at -80°C until used.

Proteins were quantified using the bicinchoninic acid colorimetric method (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Proteins were separated on a 12% acrylamide gel by SDS-PAGE and then transferred to a PVDF membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Immunodetection was done with anti-p50, anti-p65 (Delta Biolabs, Gilroy, CA, USA) and anti-TATA binding protein (TBP) (AbCam, Cambridge, MA, USA). Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA. Detection was done using Amersham[™] ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, UK) and archived using BioRad Versa Doc.

Microarrays

Cells were lysed in the appropriate volume of Trizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). 20% (v/v) of chloroform was added and spun at 12 000g for 15 minutes. The aqueous phase was passed through an RNA Easy Column (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and processed according to the manufacturer's instructions. The RNA was used to profile the DNA transcription with the GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array (Affimatrix, Santa Clara, CA, USA).

Statistical analysis

Results were expressed as the mean + standard deviation. Western blot data was analyzed using the Kruskal-Wallis test with Dunn's posttest of SPSS software to determine difference between groups. ELISA results were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA) of SPSS software. The differences among means were detected by Tukey's multiple-range test. Data was considered significantly different when the *P* value was <0.05.

Results

Cell viability

To confirm that the change in expression observed in this experiment was not caused by cell death, the viability of the small intestine cells was quantified after the digestion by the trypan blue exclusion method. The cell viability was between 80 and 90%. The viability at the end of the experiments was quantified by MTT test. Viability after 8 hours was 29% to 35% for all groups (data not shown).

L. helveticus R389 inhibits the translocation of NF- κ B.

The translocation of NF- κ B was verified by an immunodetection targeting the two predominant sub-units was carried out on IEC from mice fed *L. helveticus* R389 and control. Change in the translocation of p50 to the nucleus was not noticeable between control and mice fed milk fermented with *L. helveticus* R389 for 7 days. The challenge with LPS or *E. coli* raised the presence of the sub-unit p50 and the feeding with fermented milk prevented this augmentation (fig 13). Similar results were seen for p65 (fig 14).

L. helveticus R389 inhibits the production of inflammatory cytokines caused by LPS and E. coli.

To confirm the change made to NF- κ B in the nucleus, the production of some proteins regulated by NF- κ B were quantified. Control cells stimulated with LPS and *E. coli* significantly produced more CCL3 than the unchallenged cells. IEC from mice fed with *L. helveticus* R389 showed a modulatory effect on CCL3 production (fig.15).

The feeding of *L. helveticus* R389 alone did not stimulate the production of IL-6. The positive control LPS and the challenge with *E. coli* caused an accumulation of IL-6 in the culture supernatant. Prior feeding of mice with *L. helveticus* R389 exerted a control effect and reduced IL-6 production by IEC stimulated by *E. coli* or LPS (fig. 16).

Discussion

The immune system is known to be modulated by a level of physiological inflammation (Fiocchi 2008). With a better understanding of the immune system, like the importance of dendritic cells, the concept of self against non-self could evolve toward a threat against non-threat system (Matzinger 2007; Vance 2000). This nuance is important when dealing with bacteria in the intestine. The lamina propria is exposed to thousands of bacteria where it keeps the system at a low level of inflammation below the level induced by pathogens. This physiological inflammation is necessary to have a mature immune system (Macpherson & Harris 2004).

The transcription factor NF- κ B plays a central role in how the eukaryotic cells react to many stresses. The translocation of NF- κ B is induced by many signs of inflammation and infection like IL-1, TNF- α and bacterial and viral antigens through the TLR. NF- κ B is not only a product of inflammation but also serves to spread the inflammation in neighboring cells and the entire system (Chen *et al.* 2003). The homodimer of p50 was believed to be an inhibitor of NF- κ B since it down-regulated kappa B-specific gene expression (Schmitz & Baeuerle 1991) by competing for the site and not initiating the transcription once bound since it does not have the transactivation domain present in the Rel family (Franzoso *et al.* 1998). The p50 subunit does not contain a nuclear localization signal and needs the help of BCL3 to translocate (Franzoso *et al.* 1998). Even if on some kappa B-specific genes the p50 subunit is a down regulator, it has been observed to stimulate the IL-6 production (Mukhopadhyay *et al.* 1995).

NF- κ B is often misregulated in inflammatory diseases and cancer making it a prime target for treatments. Test using different bifidobacteria on a HT-29 cell line failed to induce an activation of NF- κ B (Riedel *et al.* 2006) but another study using freshly isolated IECs did see a translocation of p65 and a reduction of I κ B α (Pagnini *et al.* 2010). In a cell culture test with freshly isolated IECs, *L. helveticus* R389 was capable of stimulating a moderate immune response though not as potent as LPS. The amplitude of the response was able to confer a protective effect (Vinderola *et al.* 2005).

In this experiment, we verified the translocation of NF- κ B in mice fed for 2, 5 and 7 days. No significant changes were noted independently of our previous work on the effect of *L. helveticus* R389 on IL-6 production by IEC. We postulated that in the presence of a challenge modulatory immune response is enhanced and response adaptation occurs, distinguishing between pathogens and non-pathogens. The reason why the immune systems can discriminate between pathogens and probiotics is still not clear but IECs and dendritic cells could be major players (Foligne *et al.* 2007; O'Hara *et al.* 2006).

The microarray analysis did not reveal any significant change in RNA levels from tissues isolated from the small intestine between mice fed for 7 days with fermented milk and control mice (data not shown). This could be explained by the small changes the probiotic caused to a healthy host. van Baarlen *et al.* (2010) noted a large variation between individuals in response to probiotics in a similar experiment on humans.

LPS is an important constituent of the cell membrane of Gram-negative bacteria and induced an inflammatory response by binding TLR-4 (Takeuchi & Akira 2010). The signals stimulated by LPS include IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL1, CCL20 (Heumann *et al.* 1994; Sheldon & Roberts 2010). One of the pathways used by TLR-4 is NF- κ B through the adaptor protein MyD88 and TIRAP (Fitzgerald *et al.* 2001).

We saw in this experiment that prefeeding for 7 days prevented the translocation of NF- κ B to the nucleus in *ex vivo* LPS and *E. coli* challenge test. This protective effect is important as it could partially explain why IBD patients see a diminution of their symptoms. The intake of *L. helveticus* R389 could work through two mechanisms, one relating mainly to the balance between pathogenic and probiotic bacteria in their gut (O'Hara & Shanahan 2006) and the other by controlling the augmentation of NF- κ B associated with the disease (Atreya *et al.* 2008).

CCL3 also known as MIP1- α is a chemotactic cytokine that recruits polymorphonuclear neutrophils (Wolpe *et al.* 1988), T cells, B cells, eosinophils and macrophages (Mühl & Dinarello 1997). It also stimulates the production of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 from macrophages (Fahey *et al.* 1992). IL-6 is both an anti- and pro-

inflammatory cytokine produced by macrophages, lymphocytes, fibroblasts, epithelial cells and smooth muscle cells. The response to IL-6 is dependent on the specific tissue and dose (Atreya & Neurath 2008; Bruunsgaard 2005; Xing *et al.* 1998). An overproduction of IL-6 is associated with inflammation and worst prognostic in disease (Knüpfner & Preiss 2010). They are both induced by NF- κ B (Libermann & Baltimore 1990; Rezzonico *et al.* 2001). Prefeeding for 7 days of *L. helveticus* R389 prevented the induction of these cytokines by LPS and *E. coli* and correlated with the NF- κ B results.

Vinderola *et al.* (2005) reported a partial inhibition of the production of IL-6 when IECs from the small intestine were cultured with anti-mouse TLR-4 antibodies before being exposed to *L. helveticus* R389. This interaction between *L. helveticus* R389 and the TLR could be a competition to LPS and *E. coli*.

This report points out, for the first time, the particular role that *L. helveticus* plays in the modulation of immune response at the intestinal level. Once facing a cellular challenge, as it is expressed by increased inflammatory response by either LPS, or *E. coli*, IEC from mice fed *L. helveticus* showed a decreased inflammatory response when compared to IEC from non-treated mice. In addition to the modulation of physiological inflammation as we have shown previously, we also demonstrate that *L. helveticus* and/or its metabolites are able to prime the immune response to have a better control of inflammatory signal pathways as shown by NF- κ B control and inflammatory responses by cytokines.

L. helveticus R389 can inhibit the inflammatory responses to *E. coli* MM294 and could serve as a good complementary treatment to prevent abnormal inflammation in the gastrointestinal tract.

This work was supported by the Atlantic Innovation Fund and the Canadian Institutes of Health Research.

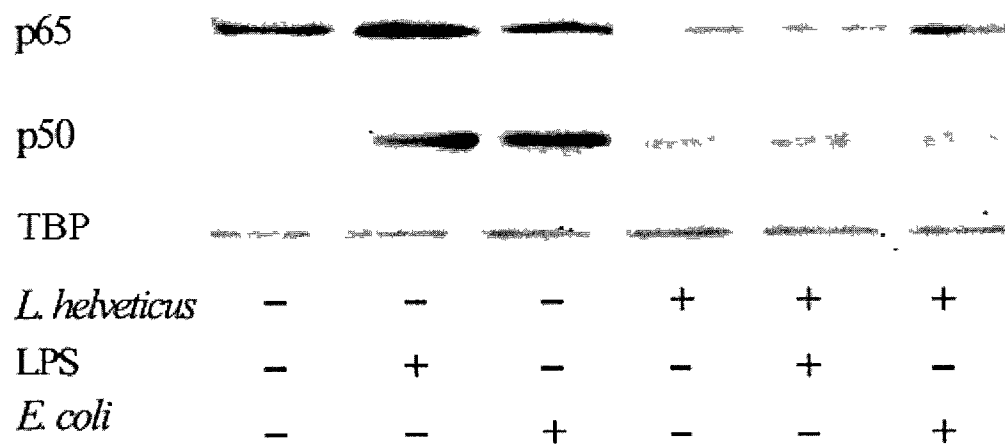


Figure 12: Representative result of a western blot for nuclear proteins extracted from cells from control mice or mice prefed fermented milk with *Lactobacillus helveticus* R389. Cells were challenged with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS or 10^7 cells/ml of *E. coli* MM294.

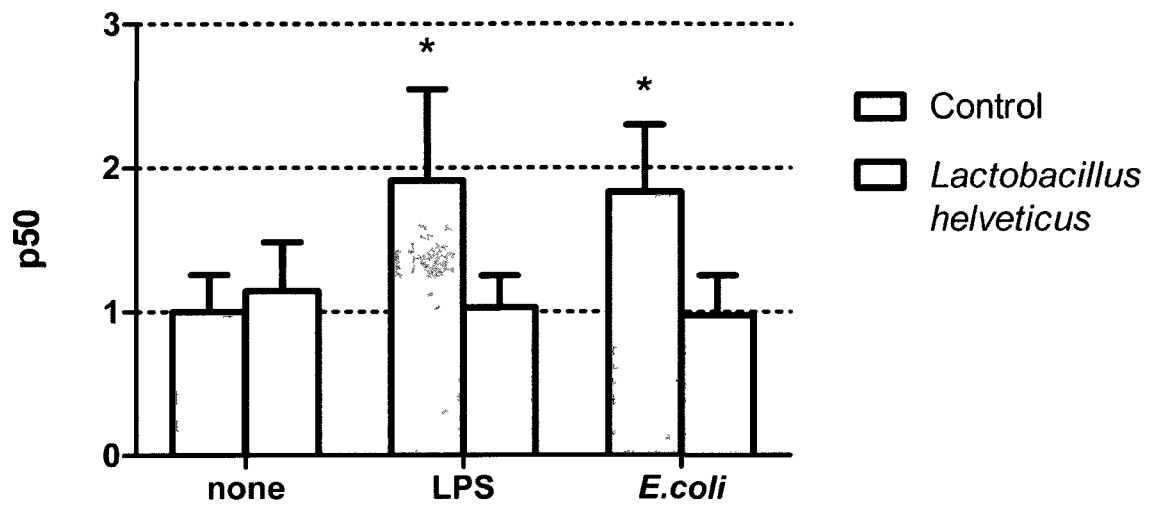


Figure 13: Relative concentration of the p50 sub-unit of NF-κB. * significantly different from control ($P < 0.05$). The error bars indicate standard deviations.

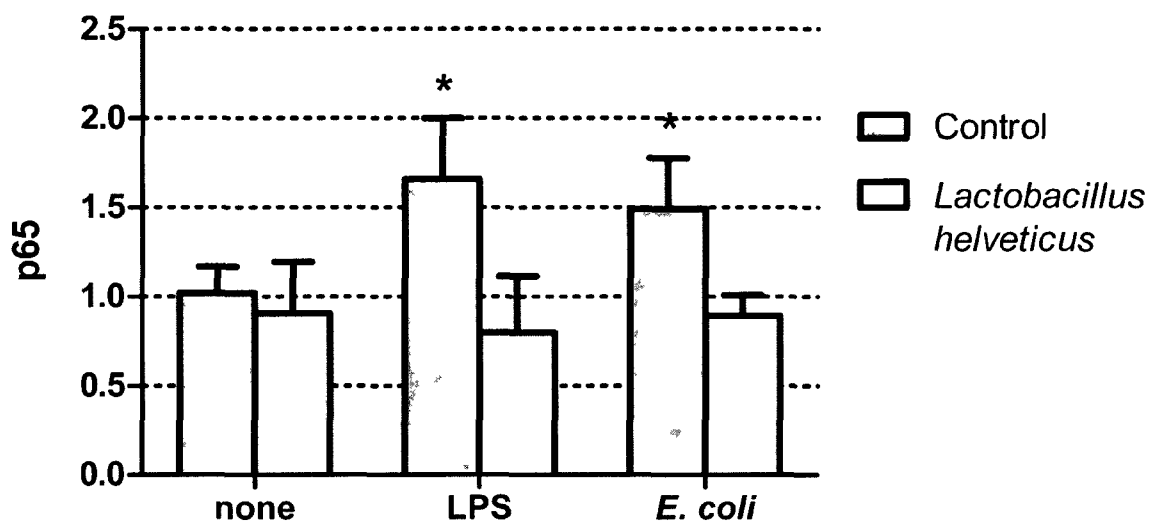


Figure 14: Relative concentration of the p65 sub-unit of NF-κB. * significantly different from control (P < 0.05). The error bars indicate standard deviations.

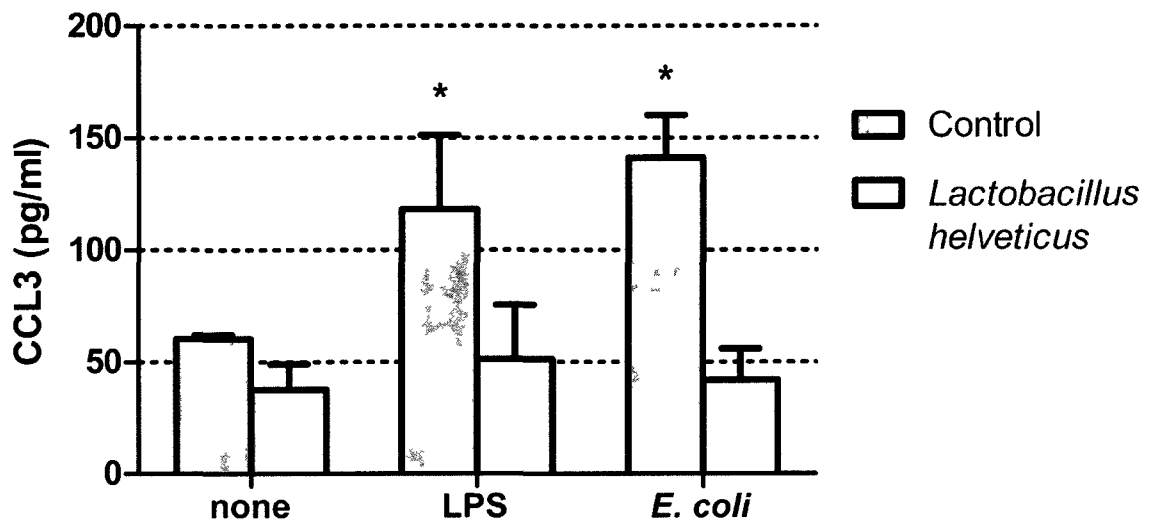


Figure 15 : Effect of *L. helveticus* prefeeding on the concentration of CCL3 in small intestine epithelial cell culture supernatant. * significantly different from control ($P < 0.05$). The error bars indicate standard deviations.

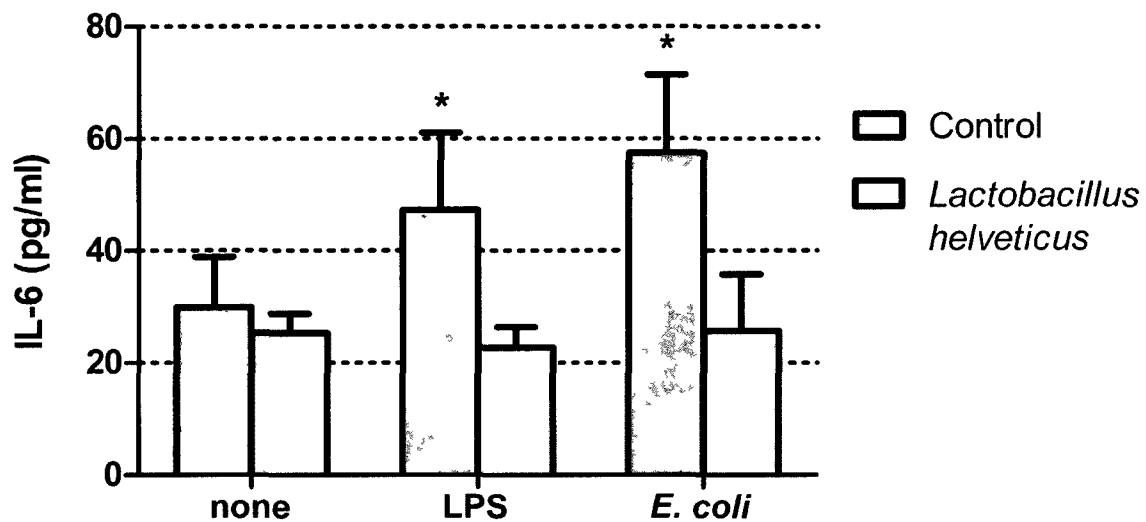


Figure 16: Effect of *L. helveticus* prefeeding on the concentration of IL-6 in small intestine epithelial cell culture supernatant. * significantly different from control ($P < 0.05$). The error bars indicate standard deviations.

Supplément

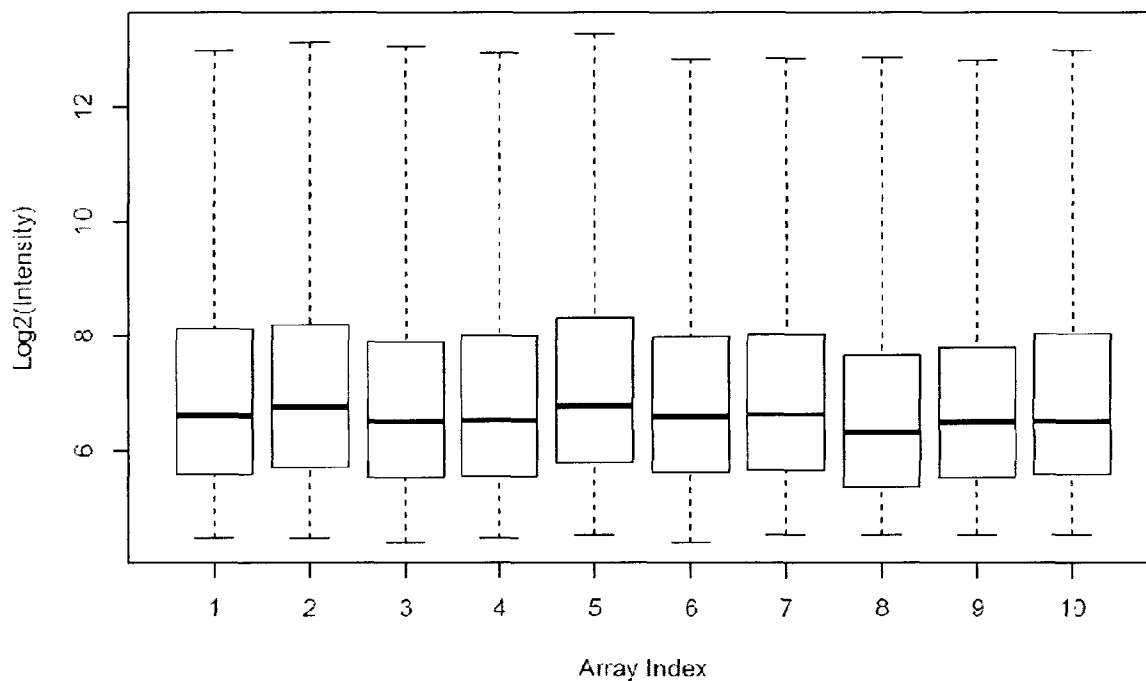


Figure 17 : Analyse qualitatif des échantillons soumis pour analyse par micropuce.

La figure 17 représente l'intensité du signal émis par les échantillons soumis à l'analyse par micropuce. La distribution de l'intensité des différents échantillons est comme attendue pour ce type d'expérience. L'intensité est semblable entre chaque échantillon ce qui signifie une bonne reproduction lors des manipulations.

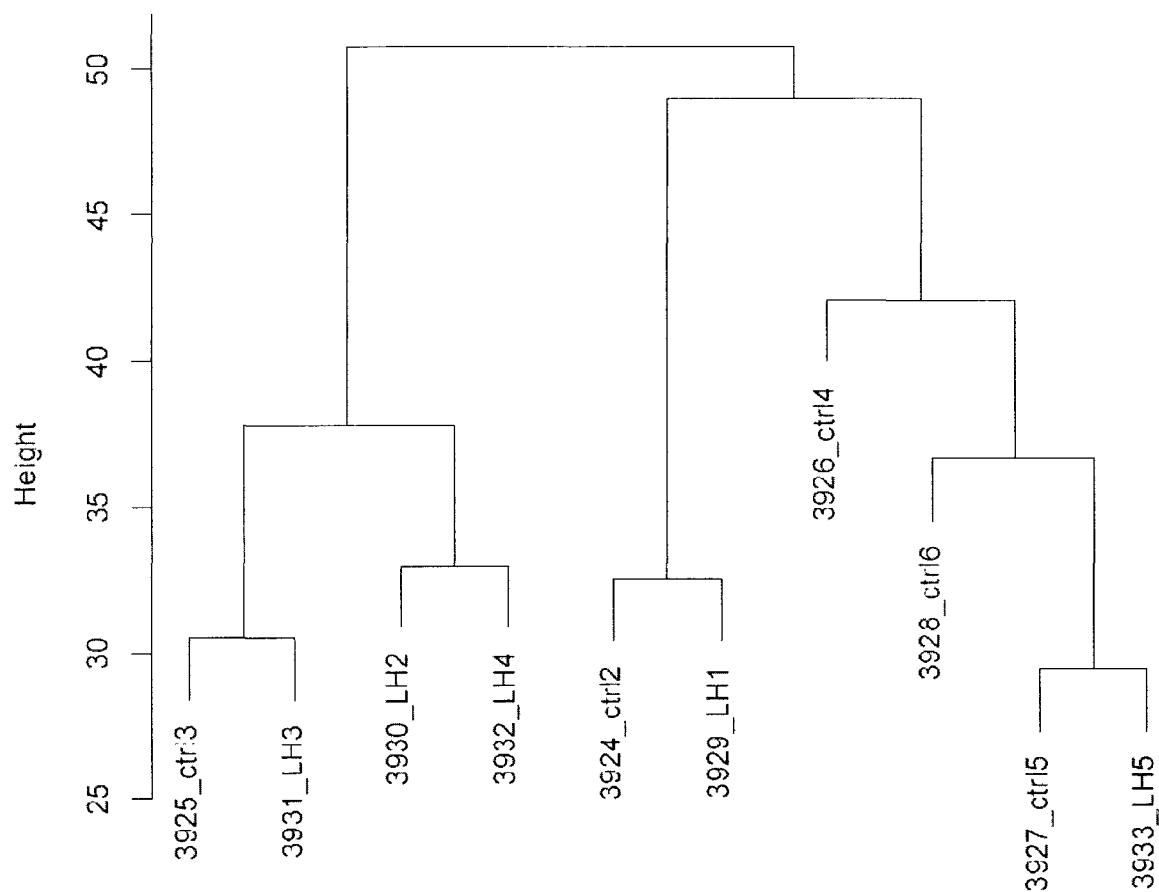


Figure 18 : Segmentation des échantillons soumis à l'analyse par micropuce.

La figure 18 démontre l'homogénéité lors de l'expression des gènes. Plus le lien entre deux échantillons est rapproché sur la hauteur, plus leur expression est semblable. Si une grande différence existait entre les souris contrôles (nommé ici ctrl) et les souris nourries avec du lait fermenté avec *L. Helveticus* R389 (nommé ici LH), deux grappes distinctes seraient visibles. Les résultats de notre expérience se divisent plutôt en trois groupes qui contiennent tous des échantillons provenant des deux groupes expérimentaux. Ceci, avec les résultats présentés dans le tableau 1, indique que *L. helveticus* R389 ne change pas l'expression de gènes lors d'une consommation de 7 jours chez la souris.

Gène	Protéine	Différence (fold)	q
<i>IL6</i>	IL-6	0.972	0.844
<i>Nfkbib</i>	I κ B β	1.039	0.846
<i>Nfkbia</i>	I κ B α	1.195	0.669
<i>Rela</i>	p65	1.053	0.835
<i>Ccl3</i>	CCL3	1.123	0.825
<i>Irak4</i>	IRAK4	0.895	0.585
<i>Irak1</i>	IRAK1	1.028	0.813
<i>Bcl3</i>	BCL3	1.076	0.822
<i>Ikkkb</i>	IKK β	1.048	0.762
<i>Chuk</i>	IKK α	0.967	0.847
<i>Ikkkg</i>	IKK γ	0.957	0.787
<i>Nfkb1</i>	P105	1.052	0.836
<i>Nfkb2</i>	P100	1.128	0.774

Tableau 1 : Sélection de quelques gènes analysés par micropuce.

9. Conclusion

Dans cette recherche, nous avons démontré l'activité immunoprotectrice du lait fermenté par le probiotique *L. helveticus* R389 lors d'une provocation par *E. coli* MM294 et par LPS. Une diminution significative de la translocation de NF- κ B au noyau a empêché une surproduction des signaux inflammatoires IL-6 et CCL3. Il est clair que la voie de signalisation de NF- κ B constitue l'un des mécanismes cellulaires par lesquels les probiotiques agissent sur la réponse immune régulatrice. L'importance du contrôle de la voie de signalisation de NF- κ B dans les processus inflammatoires est bien démontrée. NF- κ B agit au niveau de l'inflammation, la prolifération cellulaire, la survie cellulaire et la métastase des cellules tumorales.

Lors des tests d'expression génétique en utilisant des micropuces, la variance entre chaque souris fut plus grande que la différence induite par les probiotiques (voir Figure 18). Ceci est la même difficulté que nous avons affrontée lors des tests sur la translocation de NF- κ B dans l'intestin *in vivo*. Il était impossible d'utiliser des tests de provocation en culture puisqu'un certain nombre de cellules décèdent pendant la culture et réduisent la qualité de l'ARN à un niveau inutilisable. Il est à noter que recréer *in vivo* les conditions utilisées lors des tests par provocation avec *E. coli* et LPS *ex vivo* aurait nécessité des niveaux de biosécurité élevés et des manipulations des animaux très invasives et douloureuses excédant la portée de cette thèse.

Cette étude a permis, pour la première fois, de déceler l'implication de la voie de NF- κ B dans le contrôle de la réponse immunitaire lors de l'administration de *L. helveticus*. Ces résultats prometteurs nous permettent d'envisager des expériences additionnelles pour quantifier plusieurs autres protéines importantes de la voie de signalisation NF- κ B comme par exemple les I κ B totaux, la phosphorylation de I κ B et la quantification de protéines induites par NF- κ B. Ces nouvelles données contribueront à une meilleure compréhension du mécanisme d'action des probiotiques et permettront de mieux cibler des actions thérapeutiques et préventives par l'utilisation de ce type d'aliments fonctionnels. Notre équipe sera en mesure de cibler cette voie de signalisation lors des études *in vivo* sur des modèles d'infections au niveau du territoire du tissu lymphoïde associé aux muqueuses.

Bibliographie

- Abreu, M T , Thomas, L S , Arnold, E T , *et al* , 2003 TLR signaling at the intestinal epithelial interface *Journal of Endotoxin Research*, 9(5), pp 322-330
- Agostini, C , Zambello, R , Trentin, L , *et al* , 1995 Expression of TNF receptors by T cells and membrane TNF-alpha by alveolar macrophages suggests a role for TNF-alpha in the regulation of the local immune responses in the lung of HIV-1-infected patients *The Journal of Immunology*, 154(6), pp 2928-2938
- Agou, F , Ye, F , Goffinont, S , *et al* , 2002 NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20), pp 17464-17475
- Alakomi, H L , Skytta, E , Saarela, M , *et al* , 2000 Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), pp 2001-2005
- Alegria, A , Delgado, S , Roces, C , *et al* , 2010 Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk *International Journal of Food Microbiology*, 143(1-2), pp 61-66
- Alkhatib, G , Combadiere, C , Broder, C C , *et al* , 1996 CC CKR5 a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1 *Science*, 272(5270), pp 1955-1958
- Anderson, D M , Maraskovsky, E , Billingsley, W L , *et al* , 1997 A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function *Nature*, 390(6656), pp 175-179
- Anderson, R C , Cookson, A L , McNabb, W C , *et al* , 2010 *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation *BMC Microbiology*, 10, p 316
- Andriopoulou, P , Navarro, P , Zanetti, A , *et al* , 1999 Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(10), pp 2286-2297
- Antikainen, J , Anton, L , Sillanpaa, J , *et al* , 2002 Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly *Molecular Microbiology*, 46(2), pp 381-394
- Aponte, M , Fusco, V , Andolfi, R , *et al* , 2008 Lactic acid bacteria occurring during manufacture and ripening of Provolone del Monaco cheese Detection by different analytical approaches *International Dairy Journal*, 18(4), pp 403-413
- Arenzana-Seisdedos, F , Thompson, J , Rodriguez, M S , *et al* , 1995 Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B *Molecular and Cellular Biology*, 15(5), pp 2689-2696
- Asseman, C , Mauze, S , Leach, M W , *et al* , 1999 An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation *The Journal of Experimental Medicine*, 190(7), pp 995-1004
- Atreya, I , Atreya, R & Neurath, M F , 2008 NF-kappaB in inflammatory bowel disease *Journal of Internal Medicine*, 263(6), pp 591-596

- Atreya, R & Neurath, M F , 2008 Signaling molecules The pathogenic role of the IL-6/STAT-3 trans signaling pathway in intestinal inflammation and in colonic cancer *Current Drug Targets*, 9(5), pp 369-374
- Au, P -Y B & Yeh, W -C , 2007 Physiological roles and mechanisms of signaling by TRAF2 and TRAF5 *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 597, pp 32-47
- van Baarlen, P , Troost, F , van der Meer, C , *et al* , 2010 Microbes and Health Sackler Colloquium Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(Supplement 1), pp 4562-4569
- Backhed, F , Ding, H , Wang, T , *et al* , 2004 The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), pp 15718 -15723
- Baeuerle, P & Baltimore, D , 1988 I kappa B a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor *Science*, 242(4878), pp 540-546
- Baeuerle, P & Baltimore, D , 1989 A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB *Genes & Development*, 3(11), pp 1689-1698
- Barker, J N , Mitra, R S , Griffiths, C E , *et al* , 1991 Keratinocytes as initiators of inflammation *Lancet*, 337(8735), pp 211-214
- Basseres, D S & Baldwin, A S , 2006 Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression *Oncogene*, 25(51), pp 6817-6830
- Batchelor, M , Prasannan, S , Daniell, S , *et al* , 2000 Structural basis for recognition of the translocated intimin receptor (Tir) by intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* *EMBO J*, 19(11), pp 2452-2464
- Baumgart, D C & Dignass, A U , 2002 Intestinal Barrier Function *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 5(6), pp 685-694
- Baxi, S N & Phipatanakul, W , 2010 The Role of Allergen Exposure and Avoidance in Asthma *Adolescent Medicine State of the Art Reviews*, 21(1), pp 57-71
- Le Beau, M M , Ito, C , Cogswell, P , *et al* , 1992 Chromosomal localization of the genes encoding the p50/p105 subunits of NF-kappa B (NFKB2) and the I kappa B/MAD-3 (NFKB1) inhibitor of NF-kappa B to 4q24 and 14q13, respectively *Genomics*, 14(2), pp 529-531
- Beg, A A , Ruben, S M , Scheinman, R I , *et al* , 1992 I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B a mechanism for cytoplasmic retention *Genes & Development*, 6(10), pp 1899-1913
- Beg, A A , Sha, W C , Bronson, R T , *et al* , 1995 Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B *Nature*, 376(6536), pp 167-170
- Belletti, N , Gatti, M , Bottari, B , *et al* , 2009 Antibiotic resistance of *Lactobacilli* isolated from two Italian hard cheeses *Journal of Food Protection*, 72(10), pp 2162-2169
- Bertin, J , Wang, L , Guo, Y , *et al* , 2001 CARD11 and CARD14 are novel caspase recruitment domain (CARD)/membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family members that interact with BCL10 and activate NF-kappa B *The Journal of Biological Chemistry*, 276(15), pp 11877-11882

- Blank, V , Kourilsky, P & Israel, A , 1991 Cytoplasmic retention, DNA binding and processing of the NF-kappa B p50 precursor are controlled by a small region in its C-terminus *The EMBO Journal*, 10(13), pp 4159-4167
- Blonska, M , Shambharkar, P B , Kobayashi, M , *et al* , 2005 TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation *The Journal of Biological Chemistry*, 280(52), pp 43056-43063
- Boeglin, M L , Wessels, D & Henshel, D , 2006 An investigation of the relationship between air emissions of volatile organic compounds and the incidence of cancer in Indiana counties *Environmental Research*, 100(2), pp 242-254
- Borchers, A T , Selmi, C , Meyers, F J , *et al* , 2009 Probiotics and immunity *Journal of Gastroenterology*, 44(1), pp 26-46
- Bours, V , Burd, P R , Brown, K , *et al* , 1992 A novel mitogen-inducible gene product related to p50/p105-NF-kappa B participates in transactivation through a kappa B site *Molecular and Cellular Biology*, 12(2), pp 685-695
- Bours, V , Dejardin, E , Goujon-Letawe, F , *et al* , 1994 The NF-kappa B transcription factor and cancer high expression of NF-kappa B- and I kappa B-related proteins in tumor cell lines *Biochemical Pharmacology*, 47(1), pp 145-149
- Bours, V , Franzoso, G , Azarenko, V , *et al* , 1993 The oncoprotein BCL-3 directly transactivates through kappaB motifs via association with DNA-binding p50B homodimers *Cell*, 72(5), pp 729-739
- Bours, V , Villalobos, J , Burd, P R , *et al* , 1990 Cloning of a mitogen-inducible gene encoding a kappa B DNA-binding protein with homology to the *rel* oncogene and to cell-cycle motifs *Nature*, 348(6296), pp 76-80
- Bouton, Y , Guyot, P & Grappin, R , 1998 Preliminary characterization of microflora of Comté cheese *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), pp 123-131
- Brashears, M M , Reilly, S S & Gilliland, S E , 1998 Antagonistic action of cells of *Lactobacillus lactis* toward *Escherichia coli* O157 H7 on refrigerated raw chicken meat *Journal of Food Protection*, 61(2), pp 166-170
- Brasier, A R , Lu, M , Hai, T , *et al* , 2001 NF-kB-inducible BCL-3 expression is an autoregulatory loop controlling nuclear p50/NF-kB1 residence *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), pp 32080-32093
- Brat, D J , Bellail, A C & Van Meir, E G , 2005 The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis *Neuro-Oncology*, 7(2), pp 122-133
- Brunnsgaard, H , 2005 Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation *Journal of Leukocyte Biology*, 78(4), pp 819-835
- Buck, B L , Altermann, E , Svingerud, T , *et al* , 2005 Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), pp 8344-8351
- Buckland, K F , Williams, T J & Conroy, D M , 2003 Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H(4) receptor *British Journal of Pharmacology*, 140(6), pp 1117-1127

- Budde, L M , Wu, C , Tilman, C , *et al* , 2002 Regulation of I κ B β expression in testis *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), pp 4179-4194
- Bull, P , Morley, K L , Hoekstra, M F , *et al* , 1990 The mouse c-rel protein has an N-terminal regulatory domain and a C-terminal transcriptional transactivation domain *Molecular and Cellular Biology*, 10(10), pp 5473-5485
- Burkly, L , Hession, C , Ogata, L , *et al* , 1995 Expression of *relB* is required for the development of thymic medulla and dendritic cells *Nature*, 373(6514), pp 531-536
- Caballero-Franco, C , Keller, K , De Simone, C , *et al* , 2007 The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1), pp G315-322
- Cao, Z , Henzel, W J & Gao, X , 1996 IRAK a kinase associated with the interleukin-1 receptor *Science*, 271(5252), pp 1128-1131
- Cao, Z , Xiong, J , Takeuchi, M , *et al* , 1996 TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1 *Nature*, 383(6599), pp 443-446
- Cassels, F J & Wolf, M K , 1995 Colonization factors of diarrheagenic *E coli* and their intestinal receptors *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), pp 214-226
- Castellino, F , Huang, A Y , Altan-Bonnet, G , *et al* , 2006 Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction *Nature*, 440(7086), pp 890-895
- Castro, M P , Palavecino, N Z , Herman, C , *et al* , 2011 Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production *Meat Science*, 87(4), pp 321-329
- de Caterina, R & Zampolli, A , 2004 From asthma to atherosclerosis--5-lipoxygenase, leukotrienes, and inflammation *The New England Journal of Medicine*, 350(1), pp 4-7
- Celsus, C , 1935 *Celsus, De Medicina*, London Henemann
- Chen, L -W , Egan, L , Li, Z -W , *et al* , 2003 The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition Prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion *Nature Medicine*, 9(5), pp 575-581
- Chen, Z J , Parent, L & Maniatis, T , 1996 Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity *Cell*, 84(6), pp 853-862
- Chensue, S W , Shmyr-Forsch, C , Otterness, I G , *et al* , 1989 The beta form is the dominant interleukin released by murine peritoneal macrophages *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160(1), pp 404-408
- Chilov, D , Kukk, E , Taira, S , *et al* , 1997 Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C *The Journal of Biological Chemistry*, 272(40), pp 25176-25183
- Coconnier, M -H , Bernet, M -F , Kerneis, S , *et al* , 1993 Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion *FEMS Microbiology Letters*, 110(3), pp 299-305

- Collado, M C , Meriluoto, J & Salminen, S , 2007a In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus *Food Research International*, 40(5), pp 629-636
- Collado, M C , Meriluoto, J & Salminen, S , 2007b Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains *European Food Research and Technology*, 226(5), pp 1065-1073
- Connelly, M A & Marcu, K B , 1995 CHUK, a new member of the helix-loop-helix and leucine zipper families of interacting proteins, contains a serine-threonine kinase catalytic domain *Cellular & Molecular Biology Research*, 41(6), pp 537-549
- Cotter, P D , Hill, C & Ross, R P , 2005 Bacteriocins: developing innate immunity for food *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), pp 777-788
- Coussens, L M & Werb, Z , 2002 Inflammation and cancer *Nature*, 420(6917), pp 860-867
- Cremonini, F , Di Caro, S , Nista, E C , *et al* , 2002 The effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16(8), pp 1461-1467
- Cuffari, C , 2010 The genetics of inflammatory bowel disease: diagnostic and therapeutic implications *World Journal of Pediatrics*, 6(3), pp 203-209
- Damay, B G , Besse, A , Poblenz, A T , *et al* , 2007 TRAFs in RANK signaling *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 597, pp 152-159
- Davis, L M G , Martinez, I , Walter, J , *et al* , 2010 A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), pp 285-292
- Dejardin, E , Drom, N M , Delhase, M , *et al* , 2002 The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways *Immunity*, 17(4), pp 525-535
- Demigne, C , Jacobs, H , Moundras, C , *et al* , 2008 Comparison of native or reformulated chicory fructans, or non-purified chicory, on rat cecal fermentation and mineral metabolism *European Journal of Nutrition*, 47(7), pp 366-374
- Deng, L , Wang, C , Spencer, E , *et al* , 2000 Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain *Cell*, 103(2), pp 351-361
- Derjard, B , Rangaud, J , Barrett, T , *et al* , 1995 Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms *Science*, 267(5198), pp 682-685
- Dho-Moulin, M & Fairbrother, J M , 1999 Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *Veterinary Research*, 30(2-3), pp 299-316
- DiDonato, J , Mercurio, F , Rosette, C , *et al* , 1996 Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation *Molecular and Cellular Biology*, 16(4), pp 1295-1304
- DiDonato, J A , Hayakawa, M , Rothwarf, D M , *et al* , 1997 A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB *Nature*, 388(6642), pp 548-554
- Dobrzanski, P , Ryseck, R P & Bravo, R , 1995 Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100 *Oncogene*, 10(5), pp 1003-1007

- Dobrzanski, P , Ryseck, R P & Bravo, R , 1993 Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation role of the N-terminal leucine zipper-like motif *Molecular and Cellular Biology*, 13(3), pp 1572-1582
- Doi, T S , Takahashi, T , Taguchi, O , *et al* , 1997 NF- κ B RelA-deficient Lymphocytes Normal Development of T Cells and B Cells, Impaired Production of IgA and IgG1 and Reduced Proliferative Responses *The Journal of Experimental Medicine*, 185(5), pp 953 -962
- Drake, M A , Boylston, T D , Spence, K D , *et al* , 1996 Chemical and sensory effects of a *Lactobacillus* adjunct in Cheddar cheese *Food Research International*, 29(3-4), pp 381-387
- Droebner, K , Klein, B , Paxian, S , *et al* , 2010 The alternative NF-kappaB signalling pathway is a prerequisite for an appropriate immune response against lymphocytic choriomeningitis virus infection *Viral Immunology*, 23(3), pp 295-308
- Dykes, G A , 1995 Bacteriocins ecological and evolutionary significance *Trends in Ecology & Evolution*, 10(5), pp 186-189
- Eder, C , 2009 Mechanisms of interleukin-1beta release *Immunobiology*, 214(7), pp 543-553
- Ernst, M K , Dunn, L L & Rice, N R , 1995 The PEST-like sequence of I kappa B alpha is responsible for inhibition of DNA binding but not for cytoplasmic retention of c-Rel or RelA homodimers *Molecular and Cellular Biology*, 15(2), pp 872-882
- Eun, C S , Kim, Y S , Han, D S , *et al* , 2011 *Lactobacillus casei* prevents impaired barrier function in intestinal epithelial cells *APMIS Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 119(1), pp 49-56
- Evani, S J , Murthy, A K , Mareedu, N , *et al* , 2011 Hydrodynamic regulation of monocyte inflammatory response to an intracellular pathogen *PLoS ONE*, 6(1), p e14492
- Fahey, T J , Tracey, K J , Tekamp-Olson, P , *et al* , 1992 Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function *Journal of Immunology*, 148(9), pp 2764-2769
- Falck, J , Coates, J & Jackson, S P , 2005 Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage *Nature*, 434(7033), pp 605-611
- Falentin, H , Postollec, F , Parayre, S , *et al* , 2010 Specific metabolic activity of ripening bacteria quantified by real-time reverse transcription PCR throughout Emmental cheese manufacture *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), pp 10-19
- Ferrero-Miliani, L , Nielsen, O H , Andersen, P S , *et al* , 2007 Chronic inflammation importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation *Clinical and Experimental Immunology*, 147(2), pp 227-235
- Fillmore, R A , Nelson, S E , Lausch, R N , *et al* , 2003 Differential regulation of ENA-78 and GCP-2 gene expression in human corneal keratocytes and epithelial cells *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(8), pp 3432-3437
- Fiocchi, C , 2008 What is “physiological” intestinal inflammation and how does it differ from “pathological” inflammation? *Inflammatory Bowel Diseases*, 14 Suppl 2, pp S77-78
- Fitzgerald, K A , Palsson-McDermott, E M , Bowie, A G , *et al* , 2001 Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction *Nature*, 413(6851), pp 78-83

- Foligne, B , Zoumpopoulou, G , Dewulf, J , *et al* , 2007 A Key Role of Dendritic Cells in Probiotic Functionality *PLoS ONE*, 2(3), p e313
- Foti, M & Ricciardi-Castagnoli, P , 2005 Antigen sampling by mucosal dendritic cells *Trends in Molecular Medicine*, 11(9), pp 394-396
- Frank, D N , St Amand, A L , Feldman, R A , *et al* , 2007 Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), pp 13780-13785
- Franzoso, G , Bours, V , Park, S , *et al* , 1992 The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappaB-mediated inhibition *Nature*, 359(6393), pp 339-342
- Franzoso, G , Carlson, L , Poljak, L , *et al* , 1998 Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture *The Journal of Experimental Medicine*, 187(2), pp 147-159
- Frece, J , Kos, B , Svetec, I K , *et al* , 2009 Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice *The Journal of Dairy Research*, 76(1), pp 98-104
- Frey, A , Giannasca, K T , Weltzin, R , *et al* , 1996 Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells implications for microbial attachment and oral vaccine targeting *The Journal of Experimental Medicine*, 184(3), pp 1045-1059
- Fujiwara, S , Hashiba, H , Hirota, T , *et al* , 2001 Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928 suggestive evidence of blocking of the binding receptor gangliosylceramide on the cell surface *International Journal of Food Microbiology*, 67(1-2), pp 97-106
- Fuller, R , 1989 Probiotics in man and animals *The Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), pp 365-378
- Ganchi, P A , Sun, S C , Greene, W C , *et al* , 1993 A novel NF-kappa B complex containing p65 homodimers implications for transcriptional control at the level of subunit dimerization *Molecular and Cellular Biology*, 13(12), pp 7826-7835
- Gao, J L , Kuhns, D B , Tiffany, H L , *et al* , 1993 Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor *The Journal of Experimental Medicine*, 177(5), pp 1421-1427
- Garbi, N & Hammerling, G J , 2011 Co-stimulation by dendritic cells maintains the peripheral pool of Tregs *European Journal of Immunology*, 41(2), pp 282-285
- Genay, M , Sadat, L , Gagnaire, V , *et al* , 2009 prtH2, not prtH, is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus* *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), pp 3238-3249
- Ghosh, S & Karin, M , 2002 Missing pieces in the NF-kappaB puzzle *Cell*, 109(2, Supplement 1), p S81-S96
- Gibson, G R & Roberfroid, M B , 1995 Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics *The Journal of Nutrition*, 125(6), pp 1401-1412

- Gibson, G R & Wang, X , 1994 Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria *The Journal of Applied Bacteriology*, 77(4), pp 412-420
- Gilliland, S E & Speck, M L , 1975 Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in nonfermented refrigerated foods *Journal of Food Science*, 40(5), pp 903-905
- Goldin, B R , Swenson, L , Dwyer, J , *et al* , 1980 Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes *Journal of the National Cancer Institute*, 64(2), pp 255-261
- Goossens, D , Jonkers, D , Russel, M , *et al* , 2003 The effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition and metabolic activity in faeces of healthy volunteers a placebo-controlled study on the onset and duration of effects *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 18(5), pp 495-505
- Goudeau, B , Huetz, F , Samson, S , *et al* , 2003 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ deficiency reveals that a critical NF- κB dosage is required for lymphocyte survival *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), pp 15800 -15805
- Gould, D , 2010 Causes, prevention and treatment of *Escherichia coli* infections *Nursing Standard*, 24(31), pp 50-56, quiz 58
- Granucci, F & Ricciardi-Castagnoli, P , 2003 Interactions of bacterial pathogens with dendritic cells during invasion of mucosal surfaces *Current Opinion in Microbiology*, 6(1), pp 72-76
- Green, D M , Trial, J & Birdsall, H H , 1998 TNF-alpha released by comigrating monocytes promotes transendothelial migration of activated lymphocytes *Journal of Immunology*, 161(5), pp 2481-2489
- Greenhill, C J , Rose-John, S , Lissilaa, R , *et al* , 2011 IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3 *Journal of Immunology*, 186(2), pp 1199-1208
- Grishina, A , Kulikova, I , Aheva, L , *et al* , 2011 Antigenotoxic effect of kefir and ayran supernatants on fecal water-induced DNA damage in human colon cells *Nutrition and Cancer*, 63(1), pp 73-79
- Groblewska, M , Mroczo, B , Wereszczynska-Siemiatkowska, U , *et al* , 2008 Serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) levels in colorectal adenoma and cancer patients *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(10), pp 1423-1428
- Grossmann, M , Metcalf, D , Merryfull, J , *et al* , 1999 The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), pp 11848-11853
- Guan, E , Wang, J & Norcross, M A , 2001 Identification of human macrophage inflammatory proteins 1alpha and 1beta as a native secreted heterodimer *The Journal of Biological Chemistry*, 276(15), pp 12404-12409
- Hacker, H & Karin, M , 2006 Regulation and function of IKK and IKK-related kinases *Sci STKE*, 2006(357), p re13
- Harden, L M , du Plessis, I , Roth, J , *et al* , 2011 Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1 β and prostanoids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior *Psychoneuroendocrinology*, 36(5), pp 608-622

- Haruta, H , Kato, A & Todokoro, K , 2001 Isolation of a novel interleukin-1-inducible nuclear protein bearing ankyrin-repeat motifs *The Journal of Biological Chemistry*, 276(16), pp 12485 -12488
- Hase, K , Ohshima, S , Kawano, K , *et al* , 2005 Distinct gene expression profiles characterize cellular phenotypes of follicle-associated epithelium and M cells *DNA Research*, 12(2), pp 127-137
- Hatada, E N , Naumann, M & Scheidereit, C , 1993 Common structural constituents confer I kappa B activity to NF-kappa B p105 and I kappa B/MAD-3 *The EMBO Journal*, 12(7), pp 2781-2788
- Hawiger, D , Inaba, K , Dorsett, Y , *et al* , 2001 Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo *The Journal of Experimental Medicine*, 194(6), pp 769-779
- Hayashi, F , Smith, K D , Ozinsky, A , *et al* , 2001 The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5 *Nature*, 410(6832), pp 1099-1103
- Hayden, M S & Ghosh, S , 2008 Shared principles in NF-kappaB signaling *Cell*, 132(3), pp 344-362
- He, T , Priebe, M G , Zhong, Y , *et al* , 2008 Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), pp 595-604
- Heissmeyer, V , Krappmann, D , Hatada, E N , *et al* , 2001 Shared pathways of Ikb kinase-induced SCFbTrCP-mediated ubiquitination and degradation for the NF-kB precursor p105 and IkbBa *Molecular and Cellular Biology*, 21(4), pp 1024-1035
- Helbig, G , Christopherson, K W , 2nd, Bhat-Nakshatri, P , *et al* , 2003 NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4 *The Journal of Biological Chemistry*, 278(24), pp 21631-21638
- Henderson, C & Goldbach-Mansky, R , 2010 Monogenic IL-1 mediated autoinflammatory and immunodeficiency syndromes finding the right balance in response to danger signals *Clinical Immunology*, 135(2), pp 210-222
- Heumann, D , Barras, C , Severin, A , *et al* , 1994 Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes *Infection and Immunity*, 62(7), pp 2715-2721
- Hirota, T , Lee, P Y , Kuwata, H , *et al* , 2005 The nuclear Ikb protein IkbBNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria *Journal of Immunology*, 174(6), pp 3650-3657
- Hoang, B X , Shaw, G , Pham, P , *et al* , 2010 *Lactobacillus rhamnosus* cell lysate in the management of resistant childhood atopic eczema *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 9(3), pp 192-196
- Hoffmann, A , Natoli, G & Ghosh, G , 2006 Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module *Oncogene*, 25(51), pp 6706-6716
- Hofstra, C L , Desai, P J , Thurmond, R L , *et al* , 2003 Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(3), pp 1212-1221
- Hooper, L V , 2004 Bacterial contributions to mammalian gut development *Trends in Microbiology*, 12(3), pp 129-134

- Horie, M , Ishiyama, A , Fujihira-Ueki, Y , *et al* , 2002 Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer *Journal of Applied Microbiology*, 92(3), pp 396-403
- Hostager, B S , 2007 Roles of TRAF6 in CD40 signaling *Immunologic Research*, 39(1-3), pp 105-114
- Hsu, H , Huang, J , Shu, H B , *et al* , 1996 TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex *Immunity*, 4(4), pp 387-396
- Hsu, H , Xiong, J & Goeddel, D V , 1995 The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation *Cell*, 81(4), pp 495-504
- Hsueh, H -Y , Yueh, P -Y , Yu, B , *et al* , 2010 Expression of *Lactobacillus reuteri* Pg4 collagen-binding protein gene in *Lactobacillus casei* ATCC 393 increases its adhesion ability to Caco-2 cells *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), pp 12182-12191
- Huang, Q , Yang, J , Lin, Y , *et al* , 2004 Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3 *Nature Immunology*, 5(1), pp 98-103
- Huang, S , DeGuzman, A , Bucana, C D , *et al* , 2000 Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(6), pp 2573-2581
- Huang, T T , Kudo, N , Yoshida, M , *et al* , 2000 A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I kappa B alpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/I kappa B alpha complexes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), pp 1014-1019
- Huang, T T , Wuerzberger-Davis, S M , Wu, Z -H , *et al* , 2003 Sequential Modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress *Cell*, 115(5), pp 565-576
- Huxford, T , Huang, D B , Malek, S , *et al* , 1998 The crystal structure of the I kappa B alpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation *Cell*, 95(6), pp 759-770
- Ikonomidis, I , Athanassopoulos, G , Stamatelopoulos, K , *et al* , 2008 Additive prognostic value of interleukin-6 at peak phase of dobutamine stress echocardiography in patients with coronary artery disease A 6-year follow-up study *American Heart Journal*, 156(2), pp 269-276
- Inoue, J , Kerr, L D , Kakizuka, A , *et al* , 1992 I kappa B gamma, a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF-kappa B a new member of the I kappa B family *Cell*, 68(6), pp 1109-1120
- Ishida, T K , Tojo, T , Aoki, T , *et al* , 1996 TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), pp 9437-9442
- Ishikawa, H , Carrasco, D , Claudio, E , *et al* , 1997 Gastric hyperplasia and increased proliferative responses of lymphocytes in mice lacking the COOH-terminal ankyrin domain of NF-kappaB2 *The Journal of Experimental Medicine*, 186(7), pp 999-1014
- Jacobs, M D & Harrison, S C , 1998 Structure of an I kappa B alpha/NF-kappaB Complex *Cell*, 95(6), pp 749-758

- Jang, M H , Kweon, M -N , Iwatani, K , *et al* , 2004 Intestinal villous M cells An antigen entry site in the mucosal epithelium *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), pp 6110 -6115
- Janssens, S , Tinel, A , Lippens, S , *et al* , 2005 PIDD Mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage *Cell*, 123(6), pp 1079-1092
- Jenkinson, H F & Lamont, R , 1997 Streptococcal Adhesion and Colonization *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 8(2), pp 175 -200
- Jiang, Y , Woronicz, J D , Liu, W , *et al* , 1999 Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains *Science*, 283(5401), pp 543-546
- Johnson-Henry, K C , Hagen, K E , Gordonpour, M , *et al* , 2007 Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 H7 adhesion to epithelial cells *Cellular Microbiology*, 9(2), pp 356-367
- de Jong, S J , Albrecht, J -C , Schmidt, M , *et al* , 2010 Activation of noncanonical NF-kappaB signaling by the oncoprotein Tio *The Journal of Biological Chemistry*, 285(22), pp 16495-16503
- Kaila, M , Isolauri, E , Soppa, E , *et al* , 1992 Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain *Pediatric Research*, 32(2), pp 141-144
- Kaper, J B , Nataro, J P & Mobley, H L T , 2004 Pathogenic *Escherichia coli* *Nat Rev Micro*, 2(2), pp 123-140
- Karin, M & Ben-Neriah, Y , 2000 Phosphorylation meets ubiquitination the control of NF-kappaB activity *Annual Review of Immunology*, 18, pp 621-663
- Karin, M & Lin, A , 2002 NF-kappaB at the crossroads of life and death *Nature Immunology*, 3(3), pp 221-227
- Keats, J J , Fonseca, R , Chesi, M , *et al* , 2007 Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma *Cancer Cell*, 12(2), pp 131-144
- Kirjavainen, P V , Ouwehand, A C , Isolauri, E , *et al* , 1998 The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus *FEMS Microbiology Letters*, 167(2), pp 185-189
- Kishikawa, H , Miura, S , Yoshida, H , *et al* , 2002 Transmural pressure induces IL-6 secretion by intestinal epithelial cells *Clinical and Experimental Immunology*, 129(1), pp 86-91
- Kitamura, H , Kanehira, K , Okita, K , *et al* , 2000 MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production *FEBS Letters*, 485(1), pp 53-56
- Knupfer, H & Preiss, R , 2010 Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients - a summary of published results *International Journal of Colorectal Disease*, 25(2), pp 135-140
- Koboziev, I , Karlsson, F & Grisham, M B , 2010 Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1207 Suppl 1, pp E86-93
- Kollath, W , 1953 [Ernahrung und Zahnsystem] (Nutrition and the tooth system) *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 8(11), pp Suppl 7-16

- Koo, J -W , Wang, Q & Steyger, P S , 2010 Infection-mediated vasoactive peptides modulate cochlear uptake of fluorescent gentamicin *Audiology & Neuro-Otology*, 16(6), pp 347-358
- Kopp, E , Medzhitov, R , Carothers, J , *et al* , 1999 ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway *Genes & Development*, 13(16), pp 2059-2071
- Kos, B , Šušković, J , Vuković, S , *et al* , 2003 Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), pp 981-987
- Krakauer, T , Buckley, M J & Fisher, D , 2010 Proinflammatory mediators of toxic shock and their correlation to lethality *Mediators of Inflammation*, 2010, p 517594
- Krishnamoorthy, N , Oriss, T , Pagha, M , *et al* , 2007 A critical role for IL-6 secretion by dendritic cells promoting Th2 and limiting Th1 response *The Journal of Immunology*, 178(Meeting Abstracts), p S181
- Kumar, A , Singh, N K & Sinha, P R , 2010 Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine induced colon genotoxicity in rats by the administration of probiotic curd *Molecular Biology Reports*, 37(3), pp 1373-1376
- Kuno, K , Ishikawa, Y , Ernst, M K , *et al* , 1995 Identification of an I kappa B alpha-associated protein kinase in a human monocytic cell line and determination of its phosphorylation sites on I kappa B alpha *The Journal of Biological Chemistry*, 270(46), pp 27914-27919
- Lazăr, V , Miyazaki, Y , Hanawa, T , *et al* , 2009 The influence of some probiotic supernatants on the growth and virulence features expression of several selected enteroaggregative *E coli* clinical strains *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology*, 68(4), pp 207-214
- Leblanc, J , Fliss, I & Matar, C , 2004 Induction of a humoral immune response following an *Escherichia coli* O157 H7 infection with an immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus*-fermented milk *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(6), pp 1171-1181
- Lee, F S , Hagler, J , Chen, Z J , *et al* , 1997 Activation of the I kappa B alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway *Cell*, 88(2), pp 213-222
- Lee, F S , Peters, R T , Dang, L C , *et al* , 1998 MEKK1 activates both I kappa B kinase alpha and I kappa B kinase beta *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), pp 9319-9324
- Lee, I -M , 2003 Physical activity and cancer prevention - data from epidemiologic studies *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 35(11), pp 1823-1827
- Lee, Y K , Ho, P S , Low, C S , *et al* , 2004 Permanent colonization by *Lactobacillus casei* is hindered by the low rate of cell division in mouse gut *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), pp 670-674
- Lelouard, H , Henri, S , De Bovis, B , *et al* , 2010 Pathogenic bacteria and dead cells are internalized by a unique subset of Peyer's patch dendritic cells that express lysozyme *Gastroenterology*, 138(1), pp 173-184 e1-3
- Li, Q & Verma, I M , 2002 NF-kappa B regulation in the immune system *Nature Reviews Immunology*, 2(10), pp 725-734

- Li, S, Strelow, A, Fontana, E J, *et al*, 2002 IRAK-4 a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), pp 5567-5572
- Li, Z & Nabel, G, 1997 A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription *Molecular and Cellular Biology*, 17(10), pp 6184-6190
- Liao, G, Zhang, M, Harhaj, E W, *et al*, 2004 Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25), pp 26243-26250
- Libermann, T A & Baltimore, D, 1990 Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor *Molecular and Cellular Biology*, 10(5), pp 2327-2334
- Lin, L, DeMartino, G N & Greene, W C, 1998 Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome *Cell*, 92(6), pp 819-828
- Lin, W -H, Lin, C -K, Sheu, S -J, *et al*, 2009 Antagonistic activity of spent culture supernatants of lactic acid bacteria against *Helicobacter pylori* growth and infection in human gastric epithelial AGS cells *Journal of Food Science*, 74(6), pp M225-230
- Linos, E, Willett, W C, Cho, E, *et al*, 2008 Red meat consumption during adolescence among premenopausal women and risk of breast cancer *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17(8), pp 2146-2151
- Linsalata, M, Cavallini, A, Messa, C, *et al*, 2010 *Lactobacillus rhamnosus* GG influences polyamine metabolism in HGC-27 gastric cancer cell line a strategy toward nutritional approach to chemoprevention of gastric cancer *Current Pharmaceutical Design*, 16(7), pp 847-853
- Liou, H C, Nolan, G P, Ghosh, S, *et al*, 1992 The NF-kappa B p50 precursor, p105, contains an internal I kappa B-like inhibitor that preferentially inhibits p50 *The EMBO Journal*, 11(8), pp 3003-3009
- Liptay, S, Schmid, R M, Perkins, N D, *et al*, 1992 Related subunits of NF-kappa B map to two distinct loci associated with translocations in leukemia, NFKB1 and NFKB2 *Genomics*, 13(2), pp 287-292
- Liu, Y -J, 2005 IPC professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors *Annual Review of Immunology*, 23, pp 275-306
- Lkhagvadorj, E, Nagata, S, Wada, M, *et al*, 2010 Anti-infectious activity of synbiotics in a novel mouse model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection *Microbiology and Immunology*, 54(5), pp 265-275
- van Loo, J, Coussement, P, de Leenheer, L, *et al*, 1995 On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6), pp 525-552
- van Lookeren Campagne, M, Wiesmann, C & Brown, E J, 2007 Macrophage complement receptors and pathogen clearance *Cellular Microbiology*, 9(9), pp 2095-2102
- Lorick, K L, Jensen, J P, Fang, S, *et al*, 1999 RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), pp 11364 -11369

- Luckey, T D , 1972 Introduction to intestinal microecology *The American Journal of Clinical Nutrition*, 25(12), pp 1292-1294
- Lutgendorff, F , Akkermans, L M A & Soderholm, J D , 2008 The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage *Current Molecular Medicine*, 8(4), pp 282-298
- Luyer, M D , Buurman, W A , Hadfoune, M , *et al* , 2005 Strain-specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock *Infect Immun* , 73(6), pp 3686-3692
- Ma, E L , Choi, Y J , Choi, J , *et al* , 2010 The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition *International Journal of Cancer*, 127(4), pp 780-790
- Mackay, F & Schneider, P , 2009 Cracking the BAFF code *Nature Reviews Immunology*, 9(7), pp 491-502
- Mackay, F , Woodcock, S A , Lawton, P , *et al* , 1999 Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations *The Journal of Experimental Medicine*, 190(11), pp 1697-1710
- Macpherson, A J & Harris, N L , 2004 Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system *Nature Reviews Immunology*, 4(6), pp 478-485
- Male, D , 2002 Introduction au systeme immunitaire In I Roitt, J J Keats, & D Male, eds *Immunologie* Bruxelles De Boeck & Larcier, pp 10-11
- Malek, S , Chen, Y , Huxford, T , *et al* , 2001 $\text{I}\kappa\text{B}\beta$, but not $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κB dimers by masking both NF- κB nuclear localization sequences in resting cells *The Journal of Biological Chemistry*, 276(48), pp 45225 -45235
- Mannaioni, P F , Bello, M G , Raspanti, S , *et al* , 1993 Histamine release by human platelets *Agents and Actions*, 38(3-4), p C203-C205
- Mantovani, A , 2010 Molecular pathways linking inflammation and cancer *Current Molecular Medicine*, 10(4), pp 369-373
- Marchiando, A M , Shen, L , Graham, W V , *et al* , 2011 The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding *Gastroenterology*, 104(4), pp 1208-1218
- de Martin, R , Vanhove, B , Cheng, Q , *et al* , 1993 Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an I kappa B alpha-like gene is regulated by NF kappa B *The EMBO Journal*, 12(7), pp 2773-2779
- Martin, T A , Mason, M D & Jiang, W G , 2011 Tight junctions in cancer metastasis *Frontiers in Bioscience A Journal and Virtual Library*, 16, pp 898-936
- Matar, C , Amiot, J , Savoie, L , *et al* , 1996 The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during in vitro digestion *Journal of Dairy Science*, 79(6), pp 971-979
- Matar, C , Goulet, J , Bernier, R L , *et al* , 2000 Bioactive Peptides from Fermented Foods_ Their Role in the Immune System In R Fuller & G Perdigon, eds *Probiotics 3 immunomodulation by the gut microflora and probiotics* Kulwer Academic Publishers, pp 193-195

- Matar, C , Valdez, J C , Medina, M , *et al* , 2001 Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant *The Journal of Dairy Research*, 68(4), pp 601-609
- Matzinger, P , 2007 Friendly and dangerous signals is the tissue in control? *Nature Immunology*, 8(1), pp 11-13
- May, M J , D'Acquisto, F , Madge, L A , *et al* , 2000 Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex *Science*, 289(5484), pp 1550-1554
- McCully, R R & Pomerantz, J L , 2008 The protein kinase C-responsive inhibitory domain of CARD11 functions in NF-kappaB activation to regulate the association of multiple signaling cofactors that differentially depend on Bcl10 and MALT1 for association *Molecular and Cellular Biology*, 28(18), pp 5668-5686
- Medzhitov, R , Preston-Hurlburt, P & Janeway, C A , 1997 A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity *Nature*, 388(6640), pp 394-397
- Medzhitov, R , Preston-Hurlburt, P , Kopp, E , *et al* , 1998 MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways *Molecular Cell*, 2(2), pp 253-258
- Mennigen, R & Bruewer, M , 2009 Effect of probiotics on intestinal barrier function *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, pp 183-189
- Mercurio, F , Zhu, H , Murray, B W , *et al* , 1997 IKK-1 and IKK-2 cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation *Science*, 278(5339), pp 860-866
- Metchnikov, I I , 1907 *Essais optimistes*, Maloine
- Meyer, D & Stasse-Wolthuis, M , 2009 The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(11), pp 1277-1289
- Meyer, T A , Noguchi, Y , Ogle, C K , *et al* , 1994 Endotoxin stimulates interleukin-6 production in intestinal epithelial cells A synergistic effect with prostaglandin E2 *Archives of Surgery*, 129(12), pp 1290-1295
- Miller, S B , 2006 Prostaglandins in health and disease an overview *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 36(1), pp 37-49
- Miller, T L & McGee, D W , 2002 Epithelial cells respond to proteolytic and non-proteolytic detachment by enhancing interleukin-6 responses *Immunology*, 105(1), pp 101-110
- Moayyedi, P , Ford, A C , Talley, N J , *et al* , 2010 The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome a systematic review *Gut*, 59(3), pp 325-332
- Mock, B A , Connelly, M A , McBride, O W , *et al* , 1995 CHUK, a conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase, maps to human chromosome 10 and mouse chromosome 19 *Genomics*, 27(2), pp 348-351
- Moorthy, A K , Savinova, O V , Ho, J Q , *et al* , 2006 The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner *The EMBO Journal*, 25(9), pp 1945-1956
- de Moreno de LeBlanc, A & Perdigon, G , 2004 Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer *Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 10(4), pp BR96-104

- de Moreno de LeBlanc, A & Perdigon, G , 2005 Reduction of beta-glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model *Biocell*, 29(1), pp 15-24
- de Moreno de LeBlanc, A , Matar, C , Farnworth, E , *et al* , 2006 Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir *Cytokine*, 34(1-2), pp 1-8
- de Moreno de LeBlanc, A , Matar, C , LeBlanc, N , *et al* , 2005 Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model *Breast Cancer Research*, 7(4), pp R477-486
- de Moreno de LeBlanc, A , Matar, C , Theriault, C , *et al* , 2005 Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on immune cells associated to mammary glands in normal and a breast cancer model *Immunobiology*, 210(5), pp 349-358
- Morton, R S & Dongari-Bagtzoglou, A I , 1999 Regulation of gingival fibroblast interleukin-6 secretion by cyclosporine A *Journal of Periodontology*, 70(12), pp 1464-1471
- Mroczko, B , Groblewska, M , Gryko, M , *et al* , 2010 Diagnostic usefulness of serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) in the differentiation between pancreatic cancer and chronic pancreatitis *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 24(4), pp 256-261
- Muhl, H & Dinarello, C A , 1997 Macrophage inflammatory protein-1 alpha production in lipopolysaccharide-stimulated human adherent blood mononuclear cells is inhibited by the nitric oxide synthase inhibitor N(G)-monomethyl-L-arginine *Journal of Immunology (Baltimore, Md 1950)*, 159(10), pp 5063-5069
- Mukhopadhyay, T , Roth, J A & Maxwell, S A , 1995 Altered expression of the p50 subunit of the NF-kappa B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma *Oncogene*, 11(5), pp 999-1003
- Muta, T , Yamazaki, S , Eto, A , *et al* , 2003 IκB-ζ, a new anti-inflammatory nuclear protein induced by lipopolysaccharide, is a negative regulator for nuclear factor-κB *Journal of Endotoxin Research*, 9(3), pp 187-191
- Muzio, M , Ni, J , Feng, P , *et al* , 1997 IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling *Science*, 278(5343), pp 1612-1615
- Nagata, E , de Toledo, A & Oho, T , 2011 Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production *Molecular Oral Microbiology*, 26(1), pp 78-88
- Nakano, H , Oshima, H , Chung, W , *et al* , 1996 TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor *The Journal of Biological Chemistry*, 271(25), pp 14661-14664
- Nakashima, J , Tachibana, M , Horiguchi, Y , *et al* , 2000 Serum Interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer *Clinical Cancer Research*, 6(7), pp 2702 -2706
- Neutra, M R , Mantis, N J & Kraehenbuhl, J P , 2001 Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues *Nature Immunology*, 2(11), pp 1004-1009
- Neutra, M R , Pringault, E & Kraehenbuhl, J P , 1996 Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses *Annual Review of Immunology*, 14, pp 275-300
- Ng, S C , Hart, A L , Kamm, M A , *et al* , 2009 Mechanisms of action of probiotics Recent advances *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(2), pp 300-310

- Niess, J H & Adler, G , 2010 Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions *Journal of Immunology*, 184(4), pp 2026-2037
- Niess, J H , Brand, S , Gu, X , *et al* , 2005 CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance *Science*, 307(5707), pp 254-258
- Nikfar, S , Rahimi, R , Rahimi, F , *et al* , 2008 Efficacy of probiotics in irritable bowel syndrome a meta-analysis of randomized, controlled trials *Diseases of the Colon and Rectum*, 51(12), pp 1775-1780
- Ninomiya-Tsuji, J , Kishimoto, K , Hiyama, A , *et al* , 1999 The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway *Nature*, 398(6724), pp 252-256
- Nishimura, D , Ishikawa, H , Matsumoto, K , *et al* , 2006 DHMEQ, a novel NF-kappaB inhibitor, induces apoptosis and cell-cycle arrest in human hepatoma cells *International Journal of Oncology*, 29(3), pp 713-719
- Nolan, G P , Ghosh, S , Liou, H C , *et al* , 1991 DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide *Cell*, 64(5), pp 961-969
- O'Hara, A M & Shanahan, F , 2006 The gut flora as a forgotten organ *EMBO Reports*, 7(7), pp 688-693
- O'Hara, A M , O'Regan, P , Fanning, A , *et al* , 2006 Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius* *Immunology*, 118(2), pp 202-215
- O'Mahony, L , O'Callaghan, L , McCarthy, J , *et al* , 2006 Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in humans *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(4), pp G839-845
- O'Neill, L A J , 2008 The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily 10 years of progress *Immunological Reviews*, 226(1), pp 10-18
- O'Toole, P W & Cooney, J C , 2008 Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2008, p 175285
- Ober, C & Hoffjan, S , 2006 Asthma genetics 2006 the long and winding road to gene discovery *Genes and Immunity*, 7(2), pp 95-100
- Ogilvie, A C , Hack, C E , Wagstaff, J , *et al* , 1996 IL-1 beta does not cause neutrophil degranulation but does lead to IL-6, IL-8, and nitrite/nitrate release when used in patients with cancer *Journal of Immunology*, 156(1), pp 389-394
- Ohno, H , Takimoto, G & McKeithan, T W , 1990 The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control *Cell*, 60(6), pp 991-997
- Ooi, L -G , Ahmad, R , Yuen, K -H , *et al* , 2010 *Lactobacillus acidophilus* CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters *Journal of Dairy Science*, 93(11), pp 5048-5058
- Otte, J -M , Cario, E & Podolsky, D K , 2004 Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells *Gastroenterology*, 126(4), pp 1054-1070

- Pagnini, C , Saeed, R , Bamias, G , *et al* , 2010 Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), pp 454-459
- Pahl, H L , 1999 Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors *Oncogene*, 18(49), pp 6853-6866
- Pando, M P & Verma, I M , 2000 Signal-dependent and -independent degradation of free and NF- κ B-bound I κ B α *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28), pp 21278 -21286
- Parker, R B , 1974 Probiotics, the other half of the antibiotic story *Animal Nutrition and Health*, 29(4), p 8
- Paxian, S , Liptay, S , Adler, G , *et al* , 1999 Genomic organization and chromosomal mapping of mouse nuclear factor kappa B 2 (NF κ B2) *Immunogenetics*, 49(9), pp 743-750
- Perkins, N D , 2006 Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway *Oncogene*, 25(51), pp 6717-6730
- Perkins, N D & Gilmore, T D , 2006 Good cop, bad cop the different faces of NF-kappaB *Cell Death and Differentiation*, 13(5), pp 759-772
- van Pijkeren, J -P , Canchaya, C , Ryan, K A , *et al* , 2006 Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118 *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), pp 4143-4153
- de Plaen, I G , Tan, X -D , Chang, H , *et al* , 2000 Lipopolysaccharide activates nuclear factor κ B in rat intestine role of endogenous platelet-activating factor and tumour necrosis factor *British Journal of Pharmacology*, 129(2), pp 307-314
- Plant, L , Asp, V , Lovkvist, L , *et al* , 2004 Epithelial cell responses induced upon adherence of pathogenic *Neisseria* *Cellular Microbiology*, 6(7), pp 663-670
- Poltorak, A , He, X , Smirnova, I , *et al* , 1998 Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice mutations in *Tlr4* gene *Science*, 282(5396), pp 2085-2088
- Pomerantz, J L , Denny, E M & Baltimore, D , 2002 CARD11 mediates factor-specific activation of NF-kappaB by the T cell receptor complex *The EMBO Journal*, 21(19), pp 5184-5194
- Qian, Y , Commane, M , Ninomiya-Tsuji, J , *et al* , 2001 IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B *The Journal of Biological Chemistry*, 276(45), pp 41661-41667
- Rachid, M , Matar, C , Duarte, J , *et al* , 2006 Effect of milk fermented with a *Lactobacillus helveticus* R389(+) proteolytic strain on the immune system and on the growth of 4T1 breast cancer cells in mice *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 47(2), pp 242-253
- Raetz, C R , 1990 Biochemistry of endotoxins *Annual Review of Biochemistry*, 59, pp 129-170
- Rafter, J , 2004 The effects of probiotics on colon cancer development *Nutrition Research Reviews*, 17(2), pp 277-284
- Rakoff-Nahoum, S , Paglino, J , Eslami-Varzaneh, F , *et al* , 2004 Recognition of commensal microflora by Toll-Like receptors is required for intestinal homeostasis *Cell*, 118(2), pp 229-241

- Ramrani, P , Gaudier, E , Bingham, M , *et al* , 2010 Prebiotic effect of fruit and vegetable shots containing Jerusalem artichoke inulin a human intervention study *The British Journal of Nutrition*, 104(2), pp 233-240
- Randolph, G J , Ochando, J & Partida-Sanchez, S , 2008 Migration of dendritic cell subsets and their precursors *Annual Review of Immunology*, 26, pp 293-316
- Rescigno, M , Urbano, M , Valzasina, B , *et al* , 2001 Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria *Nature Immunology*, 2(4), pp 361-367
- Rezzonico, R , Imbert, V , Chicheportiche, R , *et al* , 2001 Ligation of CD11b and CD11c beta(2) integrins by antibodies or soluble CD23 induces macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta production in primary human monocytes through a pathway dependent on nuclear factor-kappaB *Blood*, 97(10), pp 2932-2940
- Ricklin, D , Hajshengallis, G , Yang, K , *et al* , 2010 Complement a key system for immune surveillance and homeostasis *Nature Immunology*, 11(9), pp 785-797
- Riedel, C -U , Foata, F , Philippe, D , *et al* , 2006 Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation *World Journal of Gastroenterology*, 12(23), pp 3729-3735
- Rivera, J , Vannakambadi, G , Hook, M , *et al* , 2007 Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria *Thrombosis and Haemostasis*, 98(3), pp 503-511
- Roberfroid, M , 2007 Prebiotics the concept revisited *The Journal of Nutrition*, 137(3 Suppl 2), p 830S-7S
- Rogers, S , Wells, R & Rechsteiner, M , 1986 Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins the PEST hypothesis *Science*, 234(4774), pp 364-368
- Roller, M , Clune, Y , Collins, K , *et al* , 2007 Consumption of prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* has minor effects on selected immune parameters in polypectomised and colon cancer patients *The British Journal of Nutrition*, 97(4), pp 676-684
- Roller, M , Rechkemmer, G & Watzl, B , 2004 Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats *The Journal of Nutrition*, 134(1), pp 153-156
- Romagnoli, G , Nisimi, R , Chiani, P , *et al* , 2004 The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of *Candida albicans* leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function *Journal of Leukocyte Biology*, 75(1), pp 117-126
- Roos, S & Jonsson, H , 2002 A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components *Microbiology*, 148(Pt 2), pp 433-442
- Roos, S , Aleljung, P , Robert, N , *et al* , 1996 A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC transporter system? *FEMS Microbiology Letters*, 144(1), pp 33-38
- Ross, G D , 1981 The inhibition of growth of spoilage microorganisms in milks by *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris* and *L. dextranicum* *Australian Journal of Dairy Technology*, 36, pp 147-152

- Rothwarf, D M , Zandi, E , Natoli, G , *et al* , 1998 IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex *Nature*, 395(6699), pp 297-300
- Rushe, M , Silvan, L , Bixler, S , *et al* , 2008 Structure of a NEMO/IKK-associating domain reveals architecture of the interaction site *Structure*, 16(5), pp 798-808
- Saito, Y , Sakamoto, M , Takizawa, S , *et al* , 2004 Monitoring the cell number and viability of *Lactobacillus helveticus* GCL1001 in human feces by PCR methods *FEMS Microbiology Letters*, 231(1), pp 125-130
- Sakakibara, J , Nagano, K , Murakami, Y , *et al* , 2007 Loss of adherence ability to human gingival epithelial cells in S-layer protein-deficient mutants of *Tannerella forsythensis* *Microbiology*, 153(Pt 3), pp 866-876
- Salazar-Gonzalez, R M , Niess, J H , Zammit, D J , *et al* , 2006 CCR6-Mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T Cells in Peyer's Patches *Immunity*, 24(5), pp 623-632
- Sallusto, F , Schaerli, P , Loetscher, P , *et al* , 1998 Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation *European Journal of Immunology*, 28(9), pp 2760-2769
- Salmimen, S , Bouley, C , Boutron, M C , *et al* , 1998 Functional food science and gastrointestinal physiology and function *British Journal of Nutrition*, 80(Supplement S1), p S147-S171
- Salyers, A A , 1984 Bacteroides of the human lower intestinal tract *Annual Review of Microbiology*, 38, pp 293-313
- Samson, S I , Memet, S , Vosshenrich, C A J , *et al* , 2004 Combined deficiency in IkappaBalpha and IkappaBepsilon reveals a critical window of NF-kappaB activity in natural killer cell differentiation *Blood*, 103(12), pp 4573-4580
- Sanchez-Sanchez, N , Riol-Blanco, L & Rodriguez-Fernandez, J L , 2006 The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells *Journal of Immunology*, 176(9), pp 5153-5159
- Sansonetti, P J , 2011 To be or not to be a pathogen that is the mucosally relevant question *Mucosal Immunology*, 4(1), pp 8-14
- Savage, D C , 1977 Microbial ecology of the gastrointestinal tract *Annual Review of Microbiology*, 31(1), pp 107-133
- Schmitz, M L & Baeuerle, P A , 1991 The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B *The EMBO Journal*, 10(12), pp 3805-3817
- Schwartz, A , Gruhl, B , Lobnitz, M , *et al* , 2003 Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants *Pediatric Research*, 54(3), pp 393-399
- Sears, C L , 2005 A dynamic partnership celebrating our gut flora *Anaerobe*, 11(5), pp 247-251
- Sedgwick, S G & Smerdon, S J , 1999 The ankyrin repeat a diversity of interactions on a common structural framework *Trends in Biochemical Sciences*, 24(8), pp 311-316
- Sen, R & Baltimore, D , 1986 Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappaB by a posttranslational mechanism *Cell*, 47(6), pp 921-928

- Senftleben, U , Cao, Y , Xiao, G , *et al* , 2001 Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway *Science*, 293(5534), pp 1495-1499
- Setia, A , Bhandari, S K , House, J D , *et al* , 2009 Development and in vitro evaluation of an *Escherichia coli* probiotic able to inhibit the growth of pathogenic *Escherichia coli* K88 *Journal of Animal Science*, 87(6), pp 2005-2012
- Sharpe, M E & Wheater, D M , 1957 *Lactobacillus helveticus* *Journal of General Microbiology*, 16(3), pp 676-679
- Shearer, M J & Newman, P , 2008 Metabolism and cell biology of vitamin K *Thrombosis and Haemostasis*, 100(4), pp 530-547
- Sheldon, I M & Roberts, M H , 2010 Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium *PLoS ONE*, 5(9), p e12906
- Sherman, P M , Johnson-Henry, K C , Yeung, H P , *et al* , 2005 Probiotics Reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 H7- and Enteropathogenic *E. coli* O127 H6-Induced Changes in Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers by Reducing Bacterial Adhesion and Cytoskeletal Rearrangements *Infection and Immunity*, 73(8), pp 5183-5188
- Shi, Y , Evans, J E & Rock, K L , 2003 Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells *Nature*, 425(6957), pp 516-521
- Shibuya, H , Yamaguchi, K , Shirakabe, K , *et al* , 1996 TAB1 an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction *Science*, 272(5265), pp 1179-1182
- Shih, V F -S , Kearns, J D , Basak, S , *et al* , 2009 Kinetic control of negative feedback regulators of NF- κ B/RelA determines their pathogen- and cytokine-receptor signaling specificity *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), pp 9619 -9624
- Shortman, K & Liu, Y -J , 2002 Mouse and human dendritic cell subtypes *Nature Reviews Immunology*, 2(3), pp 151-161
- Shumway, S D , Maki, M & Miyamoto, S , 1999 The PEST domain of IkappaB α is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain *The Journal of Biological Chemistry*, 274(43), pp 30874-30881
- Simeonidis, S , Liang, S , Chen, G , *et al* , 1997 Cloning and functional characterization of mouse IkappaBepsilon *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), pp 14372-14377
- Singh, N K , Kumar, A & Sinha, P R , 2007 Chemopreventive effect of probiotic Dahi (Curd) containing *Lactobacillus acidophilus* And *Lactobacillus casei* On 1,2 dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in rats *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 2(4), pp 195-202
- So, J -S , Kwon, H -K , Lee, C -G , *et al* , 2008 *Lactobacillus casei* suppresses experimental arthritis by down-regulating T helper 1 effector functions *Molecular Immunology*, 45(9), pp 2690-2699
- Solt, L A , Madge, L A , Orange, J S , *et al* , 2007 Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta *The Journal of Biological Chemistry*, 282(12), pp 8724-8733
- Sonnenburg, J L , Chen, C T L & Gordon, J I , 2006 Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host *PLoS Biology*, 4(12), p e413

- Spanhaak, S , Havenaar, R & Schaafsma, G , 1998 The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain *Shirota* on the intestinal microflora and immune parameters in humans *European Journal of Clinical Nutrition*, 52(12), pp 899-907
- Stappenbeck, T S , Hooper, L V & Gordon, J I , 2002 Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), pp 15451 -15455
- Statistique Canada, 2008 *Esperance de vie, table de mortalite abregee, a la naissance et a 65 ans, selon le sexe, Canada, provinces et territoires, donnees annuelles*, Ottawa Statistique Canada Available at <http://www4.hrsdc.gc.ca/3ndic1t4r@-fra.jsp?id=3> [Accessed November 17, 2010]
- Staudt, L M , Singh, H , Sen, R , *et al* , 1986 A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes *Nature*, 323(6089), pp 640-643
- Sun, S C , Ganchi, P A , Ballard, D W , *et al* , 1993 NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha evidence for an inducible autoregulatory pathway *Science*, 259(5103), pp 1912-1915
- Sun, Z H , Liu, W J , Zhang, J C , *et al* , 2010 Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk in Mongolia *Folia Microbiologica*, 55(3), pp 270-276
- Suyang, H , Phillips, R , Douglas, I , *et al* , 1996 Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), pp 5444-5449
- Takaesu, G , Ninomiya-Tsuji, J , Kishida, S , *et al* , 2001 Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway *Molecular and Cellular Biology*, 21(7), pp 2475-2484
- Takemura, N , Hagi, M , Ishizuka, S , *et al* , 2010 Inulin prolongs survival of intragastrically administered *Lactobacillus plantarum* No. 14 in the gut of mice fed a high-fat diet *The Journal of Nutrition*, 140(11), pp 1963-1969
- Takeuchi, M , Rothe, M & Goeddel, D V , 1996 Anatomy of TRAF2 Distinct domains for Nuclear Factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins *The Journal of Biological Chemistry*, 271(33), pp 19935-19942
- Takeuchi, O & Akira, S , 2010 Pattern recognition receptors and inflammation *Cell*, 140(6), pp 805-820
- Tam, W F & Sen, R , 2001 IkappaB family members function by different mechanisms *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), pp 7701-7704
- Tannock, G W , Munro, K , Harmsen, H J , *et al* , 2000 Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20 *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), pp 2578-2588
- Tapping, R I , Akashi, S , Miyake, K , *et al* , 2000 Toll-like receptor 4, but not Toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides *Journal of Immunology*, 165(10), pp 5780-5787
- Taylor, M L & Metcalfe, D D , 2001 Mast cells in allergy and host defense *Allergy and Asthma Proceedings*, 22(3), pp 115-119

- Tegethoff, S , Behlke, J & Scheidereit, C , 2003 Tetrameric oligomerization of IkappaB Kinase gamma is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation *Molecular and Cellular Biology*, 23(6), pp 2029-2041
- Ten, R M , Paya, C V , Israel, N , *et al* , 1992 The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF-kappa B indicates that it participates in its own regulation *The EMBO Journal*, 11(1), pp 195-203
- Tewari, A , Buhles, W C & Starnes, H F , 1990 Preliminary report effects of interleukin-1 on platelet counts *Lancet*, 336(8717), pp 712-714
- Thaker, P H , Han, L Y , Kamat, A A , *et al* , 2006 Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma *Nature Medicine*, 12(8), pp 939-944
- Thompson, J E , Phillips, R J , Erdjument-Bromage, H , *et al* , 1995 I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B *Cell*, 80(4), pp 573-582
- Torabian, S Z , de Semir, D , Nosrati, M , *et al* , 2009 Ribozyme-mediated targeting of Ikb γ inhibits melanoma invasion and metastasis *The American Journal of Pathology*, 174(3), pp 1009-1016
- Tortora, G J & Grabowski, S R , 1994 Le syteme digestif In *Principes d anatomie et de physiologie* Anjou Qc Centre Educatif et Culturel Inc , pp 847-862
- Tracey, K J , 1992 TNF and other cytokines in the metabolism of septic shock and cachexia *Clinical Nutrition*, 11(1), pp 1-11
- Tracey, K J & Cerami, A , 1994 Tumor necrosis factor a pleiotropic cytokine and therapeutic target *Annual Review of Medicine*, 45, pp 491-503
- Tran, K , Merika, M & Thanos, D , 1997 Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), pp 5386-5399
- Tregoning, J S , Pribul, P K , Pennycook, A M J , *et al* , 2010 The chemokine MIP1 α /CCL3 determines pathology in primary RSV infection by regulating the balance of T cell populations in the murine lung *PLoS ONE*, 5(2), p e9381
- Turley, S J , Fletcher, A L & Elpek, K G , 2010 The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs *Nature Reviews Immunology*, 10(12), pp 813-825
- Tyrer, P , Foxwell, A R , Cripps, A W , *et al* , 2006 Microbial pattern recognition receptors mediate M-Cell uptake of a Gram-Negative bacterium *Infection and Immunity*, 74(1), pp 625-631
- van Uden, P , Kenneth, N S & Rocha, S , 2008 Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB *The Biochemical Journal*, 412(3), pp 477-484
- Ueno, N , Fujiya, M , Segawa, S , *et al* , 2011 Heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function *Inflammatory Bowel Diseases*
- Vance, R E , 2000 Cutting edge commentary a Copernican revolution? Doubts about the danger theory *Journal of Immunology*, 165(4), pp 1725-1728
- Vandenbergh, P A , 1993 Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), pp 221-237

- Vergin, F , 1954 [Anti- und Probiotika] (Anti- and Probiotics) *Hippokrates*, 25(4), pp 116-119
- Verreck, F A W , de Boer, T , Langenberg, D M L , *et al* , 2006 Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation *Journal of Leukocyte Biology*, 79(2), pp 285-293
- Vinderola, G , Matar, C & Perdigon, G , 2005 Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by Gram-positive probiotic bacteria involvement of Toll-like receptors *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(9), pp 1075-1084
- Vinderola, G , Matar, C & Perdigon, G , 2007 Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella enteritidis* serovar *Typhimurium* infection in mice *Immunobiology*, 212(2), pp 107-118
- de Vita, F , Orditura, M , Auremma, A , *et al* , 1998 Serum levels of interleukin-6 as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer *Oncology Reports*, 5(3), pp 649-652
- Wang, C , Deng, L , Hong, M , *et al* , 2001 TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK *Nature*, 412(6844), pp 346-351
- Wang, L , Guo, Y , Huang, W J , *et al* , 2001 Card10 is a novel caspase recruitment domain/membrane-associated guanylate kinase family member that interacts with BCL10 and activates NF-kappa B *The Journal of Biological Chemistry*, 276(24), pp 21405-21409
- Warren, H S , Fitting, C , Hoff, E , *et al* , 2010 Resilience to bacterial infection difference between species could be due to proteins in serum *The Journal of infectious diseases*, 201(2), pp 223-232
- Whiteside, S T , Epinat, J C , Rice, N R , *et al* , 1997 I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity *The EMBO Journal*, 16(6), pp 1413-1426
- WHO, 2001 Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, a joint FAO/WHO expert consultation
- Wilhelmsen, K C , Eggleton, K & Temm, H M , 1984 Nucleic acid sequences of the oncogene *v-rel* in *reticuloendotheliosis* virus strain T and its cellular homolog, the proto-oncogene *c-rel* *Journal of Virology*, 52(1), pp 172-182
- Wine, E , Gareau, M G , Johnson-Henry, K , *et al* , 2009 Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of human intestinal epithelial cells *FEMS Microbiology Letters*, 300(1), pp 146-152
- Wolff, B , Burns, A R , Middleton, J , *et al* , 1998 Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies *The Journal of Experimental Medicine*, 188(9), pp 1757-1762
- Wolpe, S D , Davatelis, G , Sherry, B , *et al* , 1988 Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties *The Journal of Experimental Medicine*, 167(2), pp 570-581
- Wong, V K , Lee, T K & Yoshida, E M , 2007 Estimating the economic burden of inflammatory bowel disease in Canada physician office visits and mesalamine prescriptions dispensed as surrogate markers *The American Journal of Gastroenterology*, 102(11), pp 2602-2603, author reply 2603-2604

- Wong, Y , Sethu, C , Louafi, F , *et al* , 2011 Lipopolysaccharide Regulation of Toll-Like Receptor-4 and Matrix Metalloprotease-9 in Human Primary Corneal Fibroblast Cells *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(5), pp 2796-2803
- Woronicz, J D , Gao, X , Cao, Z , *et al* , 1997 IkappaB kinase-beta NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK *Science*, 278(5339), pp 866-869
- Wostmann, B S , Larkin, C , Moriarty, A , *et al* , 1983 Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats *Laboratory animal science*, 33(1), pp 46-50
- Wu, Z -H , Shi, Y , Tibbetts, R S , *et al* , 2006 Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli *Science*, 311(5764), pp 1141-1146
- Wulczyn, F G , Naumann, M & Scheidereit, C , 1992 Candidate proto-oncogene *bcl-3* encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B *Nature*, 358(6387), pp 597-599
- Wutzke, K D , Lotz, M & Zipprich, C , 2010 The effect of pre- and probiotics on the colonic ammonia metabolism in humans as measured by lactose-[(15)N(2)]ureide *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(10), pp 1215-1221
- Xia, Y , Wu, Z , Su, B , *et al* , 1998 JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension *Genes & Development*, 12(21), pp 3369 -3381
- Xiao, G , Fong, A & Sun, S -C , 2004 Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation *The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), pp 30099-30105
- Xiao, G , Harhaj, E W & Sun, S C , 2001 NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100 *Molecular Cell*, 7(2), pp 401-409
- Xing, Z , Gauldie, J , Cox, G , *et al* , 1998 IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses *The Journal of Clinical Investigation*, 101(2), pp 311-320
- Xu, H , Jeong, H S , Lee, H Y , *et al* , 2009 Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains *Letters in Applied Microbiology*, 49(4), pp 434-442
- Xu, J , Bjursell, M K , Himrod, J , *et al* , 2003 A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis *Science*, 299(5615), pp 2074-2076
- Yamamoto, Y & Gaynor, R B , 2001 Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer *Journal of Clinical Investigation*, 107(2), pp 135-142
- Yamamoto-Furusho, J -K & Podolsky, D -K , 2007 Innate immunity in inflammatory bowel disease *World Journal of Gastroenterology WJG*, 13(42), pp 5577-5580
- Yamaoka, S , Courtois, G , Bessia, C , *et al* , 1998 Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation *Cell*, 93(7), pp 1231-1240
- Yamazaki, S , Muta, T & Takeshige, K , 2001 A Novel I κ B Protein, I κ B- ζ , Induced by Proinflammatory Stimuli, Negatively Regulates Nuclear Factor- κ B in the Nuclei *The Journal of Biological Chemistry*, 276(29), pp 27657 -27662

- Yang, J , Lin, Y , Guo, Z , *et al* , 2001 The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation *Nature Immunology*, 2(7), pp 620-624
- Yao, J , Kim, T W , Qin, J , *et al* , 2007 Interleukin-1 (IL-1)-induced TAK1-dependent Versus MEKK3-dependent NFkappaB activation pathways bifurcate at IL-1 receptor-associated kinase modification *The Journal of Biological Chemistry*, 282(9), pp 6075-6089
- Yokoo, T & Kitamura, M , 1996 Dual regulation of IL-1 beta-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF-kappa B and AP-1 *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 270(1), pp F123-130
- Yu, J , Jang, S -O , Kim, B -J , *et al* , 2010 The effects of *Lactobacillus rhamnosus* on the prevention of asthma in a murine model *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 2(3), pp 199-205
- Yuksekdag, Z N , Beyath, Y & Aslim, B , 2004 Metabolic activities of *Lactobacillus* spp strains isolated from kefir *Die Nahrung*, 48(3), pp 218-220
- Zandi, E , Rothwarf, D M , Delhase, M , *et al* , 1997 The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation *Cell*, 91(2), pp 243-252
- Zhang, L , Li, N , Caicedo, R , *et al* , 2005 Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells *The Journal of Nutrition*, 135(7), pp 1752-1756
- Zhang, Y H , Lin, J X & Vilcek, J , 1990 Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence *Molecular and Cellular Biology*, 10(7), pp 3818-3823
- Zhou, Y , Qin, H , Zhang, M , *et al* , 2010 *Lactobacillus plantarum* inhibits intestinal epithelial barrier dysfunction induced by unconjugated bilirubin *The British Journal of Nutrition*, 104(3), pp 390-401
- Zlotnik, A & Yoshie, O , 2000 Chemokines a new classification system and their role in immunity *Immunity*, 12(2), pp 121-127

