



# Sécurité microbiologique de la viande de bœuf

**Comprendre comment les souches *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) persistent dans le tube digestif des bovins**

**Mots-clés :** viande hachée, toxi-infection alimentaire, EHEC, compétition nutritionnelle, probiotiques

**Auteurs :** Yolande Bertin<sup>1</sup>, Evelyne Forano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité UR454 Microbiologie, INRA de Clermont-Ferrand-Theix, 63122 St Genès-Champagnelle.

\* E-mail de l'auteur correspondant : [yolande.bertin@clermont.inra.fr](mailto:yolande.bertin@clermont.inra.fr)

**Les souches EHEC sont hébergées dans le tractus digestif des bovins et peuvent contaminer accidentellement la viande de bœuf au moment de l'abattage. Il est important de savoir comment ces souches se multiplient chez l'animal afin de pouvoir combattre leur prolifération et dissémination.**

## Résumé :

Des produits d'origine animale (en particulier la viande de bœuf hachée) peuvent être contaminés par des souches d'*Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) et provoquer des toxi-infections alimentaires. Le réservoir naturel de ces souches étant le tractus digestif (TD) du bovin, il est important de mettre en place des stratégies permettant de limiter le portage de ces souches par l'animal. Un des moyens envisagés consisterait à ajouter dans l'alimentation des animaux des microorganismes de type probiotiques qui consommeraient préventivement les nutriments nécessaires au développement des EHEC dans le TD de l'animal.

Nous avons montré que les EHEC utilisent très efficacement les sucres provenant du mucus qui recouvre la paroi de l'intestin du bovin. En particulier, les souches EHEC ont besoin d'assimiler le mannose, le N-acétyl-glucosamine, l'acide N-acétyl neuraminique et le galactose pour une croissance optimale. D'autre part, nous avons démontré que l'utilisation de l'éthanolamine (EA) comme source d'azote est également requise pour un développement optimal des EHEC dans l'intestin de l'animal. L'EA est un composant majeur de la membrane des cellules de l'animal, des plantes et des bactéries pouvant être libéré dans le TD du ruminant.

Bien qu'ultra minoritaires au sein du microbiote intestinal, les souches EHEC assimilent le mannose, le N-acétyl-glucosamine, l'acide N-acétyl neuraminique et le galactose plus rapidement et plus efficacement que les bactéries du microbiote intestinal alors que les enzymes nécessaires à l'assimilation de l'EA sont absents chez les bactéries du microbiote. Les souches EHEC se sont donc spécialisées dans l'utilisation de composés qui sont peu ou pas assimilés par les bactéries du microbiote intestinal et qui constituent une niche écologique pour les souches EHEC.

Des études doivent être menées pour identifier des souches probiotiques (levures ou bactéries lactiques) entrant en compétition avec les EHEC pour ces différents composés. Ces probiotiques, ajoutés en grand nombre dans l'alimentation des animaux, priveront les souches EHEC de sources de nutriments importantes limitant ainsi le portage des souches EHEC par l'animal et la contamination des aliments.

## Abstract: Microbiological security of beef

The bovine gastrointestinal tract is the main reservoir for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) responsible for food-borne infections. Some compounds (carbohydrates included in the mucus layer, ethanolamine from the membranes of epithelial cells or bacteria) are required for an optimal growth of EHEC in the intestine of ruminants. Bacterial strains, such as probiotics, with a high affinity for these compounds, could be added into the ruminant diet, depriving EHEC strains of these nutrients and consequently limiting the shedding of EHEC in animals and food contamination.

We show that EHEC use sugar coming from the mucus layer of the intestine very efficiently. The EHEC strains need to assimilate mannose, N-acetyl-glucosamine, N-acetyl neuraminic acid and galactose for maximal growth. In addition, we show that the use of ethanolamine (EA) as a source of nitrogen is also required for an optimal development of EHEC in the animal's intestine. EA is a major component of the cell membrane of animals, plants and bacteria that can be released in the digestive tract of the ruminant.

Although EHEC strains are present in small quantities in the intestine, they assimilate mannose, N-acetyl glucosamine and N-acetyl neuraminic acid more rapidly and efficiently than the bacteria of the intestinal microbiota, even though the enzymes necessary for assimilating EA are absent from the microbiota bacteria. The EHEC strains have therefore specialized themselves in the use of compounds that are poorly or not assimilated by the bacteria of the intestinal microbiota, therefore creating an ecological niche for EHEC strains.

Studies must be performed to identify the probiotic strains (yeast or lactic acid bacteria) that compete with EHEC for these different components. These probiotics, added in large quantities to an animal's diet, will therefore deprive the EHEC strains of important nutrients therefore limiting the carriage of EHEC strains by the animal and contamination of food.

## INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont responsables de toxi-infections alimentaires pouvant aller d'une diarrhée aqueuse bénigne jusqu'à des maladies beaucoup plus graves telles que le syndrome hémolytique et urémique (à l'origine d'une atteinte rénale sévère) chez l'enfant ou le purpura thrombotique thrombocytopénique (pouvant être à l'origine d'une grave atteinte du système nerveux central) chez l'adulte. Les souches EHEC de sérotype O157:H7 font partie des souches les plus virulentes et sont responsables d'une grande partie des atteintes sévères. Les EHEC produisent des toxines (shigatoxines) dans l'intestin humain, qui passent dans la circulation sanguine pour atteindre les cellules endothéliales, en particulier du côlon, du rein ou de l'encéphale, d'où les principales lésions rencontrées chez le malade.

Le réservoir naturel des principales souches EHEC est le tractus digestif des ruminants domestiques, principalement les bovins, qui sont porteurs sains. Les souches pathogènes sont disséminées par excréation dans les matières fécales et peuvent ensuite contaminer, directement ou indirectement, différentes denrées alimentaires (viande, lait, fromage, légumes). Les principaux aliments à risque sont par ordre

d'importance: 1) les viandes de bœuf hachées consommées crues ou insuffisamment cuites, 2) le lait cru ou les produits au lait cru et 3) certains légumes ou fruits consommés crus ou encore certains jus de fruit non pasteurisés (jus de pommes). En France, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a recensé 22 cas de syndrome hémolytique et urémique après ingestion de viande hachée de bœuf contaminée par des EHEC O157:H7 entre 2011 et 2012 (1). En France également, entre 0.2% et 0.48% des bovins à l'abattoir sont porteurs de souches *E. coli* O157 dans leur tube digestif (1) et jusqu'à 4,5% des jeunes bovins peuvent être porteurs de souches EHEC potentielles de différents sérogroupes (2). Même si les toxi-infections à EHEC ne sont pas souvent à l'origine d'épidémies de grande ampleur, elles sont cependant considérées comme une préoccupation de santé publique en raison de la gravité des syndromes engendrés. Il est important de mettre en place des stratégies permettant de limiter le portage sain par les ruminants, et par conséquent l'excrétion fécale de ces bactéries pathogènes. Ces stratégies devraient permettre de limiter la propagation des souches EHEC dans la chaîne alimentaire de l'homme.

## I. STRATEGIES DE LIMITATION DU PORTAGE

En laboratoire, différentes souches bactériennes (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus. crispatus*, *Propionibacterium freudenreichii* voire même certaines souches non pathogènes d'*Escherichia coli*) ont été proposées pour limiter le portage des souches pathogènes par l'animal. Une inhibition de la croissance des EHEC par ces souches antagonistes (probiotiques) a pu ainsi être mise en évidence *in vitro*. Sur le terrain, les souches antagonistes sont évaluées sur la réduction de l'excrétion fécale de souches EHEC naturellement présentes chez l'animal. Cependant, l'interprétation des résultats reste très difficile du fait de la grande variabilité existant entre les animaux.

Les mécanismes d'action de ces souches antagonistes sont encore très mal connus. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer leur capacité à inhiber la croissance des EHEC : 1) production d'acides organiques (lactique, acétique, propionique) au cours de la fermentation ayant pour conséquence une acidification du milieu intestinal 2) production de peptides soit antimicrobiens (type antibiotique) soit entrant en compétition avec les EHEC pour adhérer à la paroi intestinale et 3) modulation de l'équilibre de la flore digestive autochtone dans un sens défavorable à l'implantation des EHEC.

Des stratégies nutritionnelles peuvent aussi être envisagées. Chez le mammifère, il existe une très forte compétition nutritionnelle parmi les bactéries constituant le microbiote intestinal (ou flore intestinale). On dénombre jusqu'à  $10^{14}$  bactéries au sein du microbiote intestinal composé de plus de 1 000 espèces différentes de microorganismes. Chaque espèce bactérienne doit pouvoir utiliser un ou quelques nutriments plus efficacement que les autres espèces microbiennes afin de pouvoir se maintenir dans cet écosystème très complexe. D'une manière générale, les bactéries doivent disposer de sources de carbone, d'azote et d'énergie pour se multiplier. Dans le tube digestif du ruminant, ces nutriments proviennent de la ration alimentaire transitant dans l'intestin mais également de produits déversés par l'animal dans son tube digestif. Par ailleurs, le renouvellement naturel des cellules de l'animal s'accompagne de la mort et de la destruction des cellules constituant la paroi intestinale. Les molécules entrant dans la composition de ces cellules sont alors déversées dans la lumière intestinale et sont ensuite utilisées comme nutriments par les bactéries du microbiote.

## II. RECHERCHE AU SEIN DE L'UNITE MICROBIOLOGIE DE L'INRA DE CLERMONT-FERRAND-THEIX

Nous étudions les nutriments présents dans le tube digestif du bovin et pouvant être utilisés par les souches EHEC pour assurer leur multiplication. Dans le rumen, les EHEC résistent mal aux conditions spécifiques de ce compartiment digestif (anaérobiose stricte) (3, 4) mais les bactéries qui franchissent cette barrière rencontrent des conditions plus favorables dans l'intestin grêle (5, 6). Cependant, la composition en nutriments du contenu de l'intestin grêle est très peu connue. Avant de mettre en place des stratégies nutritionnelles afin de limiter le portage des

EHEC par le ruminant, des recherches plus fondamentales sont nécessaires afin de connaître la composition du contenu de l'intestin grêle d'une part et les voies métaboliques préférentiellement utilisées par les EHEC dans ce compartiment d'autre part. Ces dernières années nous avons pu mettre en évidence que 1) les sucres entrant dans la composition du mucus recouvrant l'intestin grêle du bovin constituent d'importantes sources de carbone pour les EHEC et 2) l'éthanolamine est une source d'azote spécifique des EHEC dans ce compartiment digestif.

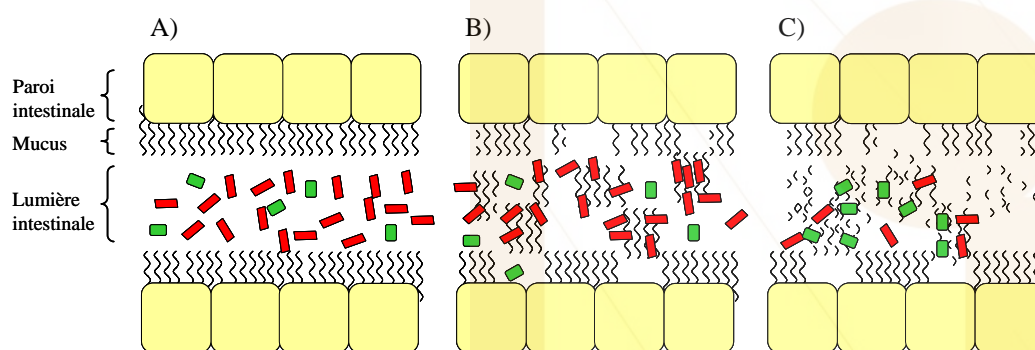
### III. SOURCE DE CARBONE DANS DES CONTENUS DIGESTIFS BOVINS

D'une manière générale, les sources de carbone préférées des souches *Escherichia coli* sont les sucres simples, en particulier le glucose. La cellulose et l'amidon, représentant une part importante de la ration alimentaire du ruminant, sont des polymères de glucose. Cependant, les souches *E. coli* ne possèdent pas l'équipement enzymatique leur permettant de dégrader ces polymères pour utiliser le glucose les constituant et le glucose sous forme libre n'est retrouvé qu'en très faible quantité dans les contenus d'intestin grêle de bovins ( $63 \text{ mg L}^{-1}$ ) (6).

La couche de mucus recouvrant la paroi intestinale représente une source de carbone alternative pour les microorganismes du tube digestif des mammifères. Le mucus, composé de longs filaments d'oligosaccharides fixés à des molécules d'acides aminés, forme un réseau tridimensionnel tapissant la paroi intestinale (7). Cette couche de mucus a pour fonction de 1) lubrifier la paroi

intestinale afin de favoriser le transit intestinal et 2) protéger la paroi de l'intestin des sécrétions digestives et des bactéries pathogènes (8). Au cours du renouvellement cellulaire, 25% des cellules intestinales et des structures qui les recouvrent, sont quotidiennement déversés dans la lumière intestinale. Les oligosaccharides constituant la couche de mucus sont ainsi libérés dans le tractus digestif. Les bactéries anaérobies du microbiote intestinal du ruminant sont capables d'hydrolyser ces oligosaccharides et de libérer les sucres simples dans la lumière intestinale. Six sucres majeurs (galactose, N-acétyl-glucosamine, N-acétyl-galactosamine, fucose, mannose et acide N-acétyl neuraminique) constituent la partie glucidique du mucus de l'intestin grêle du bovin (7). Le mucus intestinal est ainsi une source de nutriments constamment renouvelée et facilement accessible aux bactéries du tube digestif (Fig. 1).

**Figure 1 : Les sucres du mucus sont déversés dans la lumière intestinale**

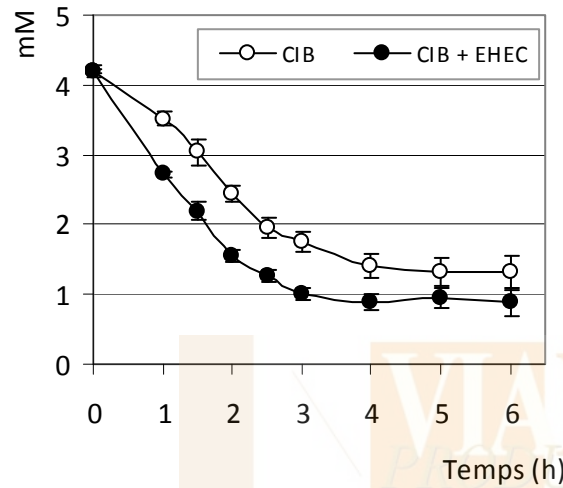


- A) Les bactéries du microbiote intestinal (rouge) et les bactéries EHEC (vert) transitent dans l'intestin grêle du bovin ;  
B) Lors du renouvellement cellulaire, les chaînes de polymères de sucres composant la couche de mucus sont déversées dans la lumière intestinale ;  
C) De nombreuses bactéries endogènes peuvent hydrolyser les polymères et libérer les sucres simples qui constitueront ensuite une source de carbone pour les souches EHEC.

Les études menées au laboratoire ont été réalisées à partir de contenus digestifs de vaches prélevés à l'abattoir expérimental du Centre INRA de Clermont-Ferrand-Theix. L'intestin grêle des animaux a été isolé de l'ensemble du tube digestif et son contenu a été prélevé sous une atmosphère d'azote (anaérobiose) afin de préserver la viabilité du microbiote intestinal. Une souche EHEC a ensuite été incubée dans des échantillons de contenus d'intestin bovins (CIB) et la disparition des sucres a été analysée. Nous avons ainsi détecté et quantifié les six sucres majeurs du mucus dans des échantillons de CIB, le galactose ( $257 \text{ mg L}^{-1}$ ) et le N-acétyl-glucosamine ( $197 \text{ mg L}^{-1}$ ) étant les plus abondants. La souche EHEC assimile rapidement et simultanément l'ensemble des sucres libérés à partir du mucus mais le plus important est que chacun des six sucres est consommé plus rapidement par la souche EHEC que par les bactéries du microbiote intestinal (Fig. 2). Ces résultats

mettent ainsi en évidence la grande efficacité d'assimilation des sucres du mucus par la souche EHEC. En suivant l'expression de certains gènes, nous avons également pu identifier les mécanismes enzymatiques et les voies métaboliques activés par la bactérie pour dégrader ces sucres et les utiliser comme source de carbone (6). Nous avons ensuite construit, par manipulation génétique de la souche EHEC, des mutants incapables d'assimiler chacun des 6 sucres et nous avons incubé chacun de ces mutants dans des échantillons de CIB en présence de la souche EHEC non-mutée. Nous avons alors observé un déficit de croissance important pour les souches mutées incapables d'assimiler 4 des 6 sucres (mannose, N-acétyl-glucosamine, acide N-acétyl neuraminique, galactose) (un exemple de culture en compétition est représenté sur la Fig. 3). Ces résultats confirment l'importance de ces quatre sucres pour la croissance des EHEC dans le CIB.

**Figure 2 :** La souche EHEC consomme les sucres du mucus de l'intestin grêle plus efficacement que les bactéries du microbiote intestinal

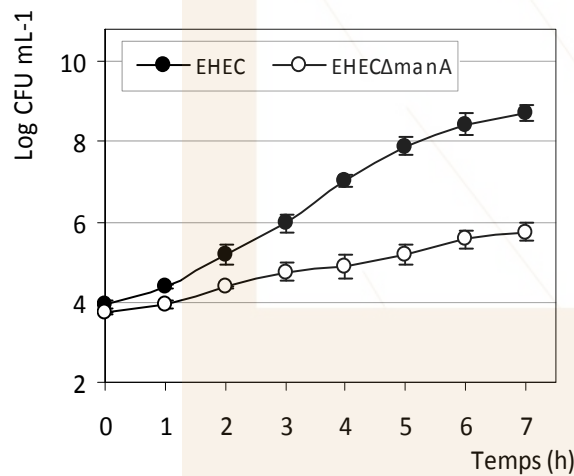


Une consommation des sucres du mucus par les bactéries du microbiote intestinal (o) est observée au cours du temps. Lorsque le contenu intestinal bovin (CIB) est inoculé par une souche EHEC (●), les sucres disparaissent plus rapidement dès la première heure d'incubation.

**Légende technique :**

Des échantillons de CIB sont incubés à 39°C (température corporelle de l'animal) avec un apport minimal en oxygène afin de permettre une multiplication du microbiote intestinal. Les sucres sont quantifiés par une technique de chromatographie gazeuse. Cette technique de séparation est basée sur une vaporisation du milieu complexe à analyser à l'entrée d'une colonne, puis à son transport à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur. Les différentes molécules du mélange vont ensuite se séparer selon l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.

**Figure 3 :** La souche EHEC doit assimiler le mannose pour bénéficier d'une croissance optimale dans le contenu intestinal bovin.



**Légende technique :**

La mutation du gène *manA* est responsable de l'incapacité de la souche EHEC à assimiler le mannose. La mutation est créée par la technique dite d'« échange d'allèle » où le gène *manA* est remplacé par un gène codant une résistance à un antibiotique. La souche mutée et la souche non-mutée sont incubées dans un échantillon de CIB à une même concentration ( $10^4$  bactéries  $\text{mL}^{-1}$  de CIB). Toutes les heures un échantillon est prélevé puis étalé sur un milieu de culture gélosé contenant un antibiotique (la souche mutée et la souche non-mutée étant résistantes à des antibiotiques différents). Les bactéries sont ensuite dénombrées après incubation une nuit à 37°C. Le nombre de bactéries est transformé en base logarithmique.

Les souches EHEC sont retrouvées dans le tube digestif (TD) des bovins à des concentrations de l'ordre de  $10^3$  à  $10^4$  bactéries par gramme de contenu intestinal. Elles sont donc ultra minoritaires au sein des bactéries du microbiote de l'intestin grêle de l'animal ( $10^8$  à  $10^9$  bactéries par g de contenu intestinal) qui sont dans leur grande majorité

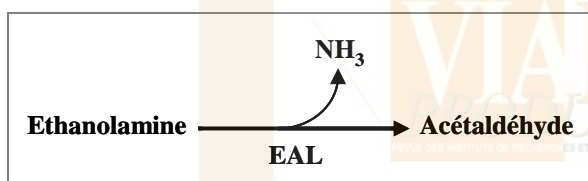
capables d'assimiler des sucres sous forme de polymères. Il semble ainsi que les souches EHEC se soient spécialisées dans une assimilation efficace des sucres simples issus du mucus alors que les bactéries du microbiote intestinal consomment préférentiellement les polymères de ces sucres.

## IV. SOURCE D'AZOTE DANS DES CONTENUS DIGESTIFS BOVINS

Nous avons également montré que l'utilisation de l'éthanolamine (EA) comme source d'azote est requise pour un développement optimal des EHEC dans l'intestin grêle du ruminant. L'EA est une petite molécule présente dans le phosphatidyléthanolamine, un des composants majeurs de la membrane des cellules à la fois de l'animal, des plantes et des bactéries. Ce composé est libéré dans le tractus digestif lors de la destruction des cellules végétales provenant de l'alimentation ou des bactéries du microbiote intestinal.

Pour démontrer l'importance de l'EA, nous avons bloqué la voie métabolique d'assimilation de cette molécule chez la souche EHEC en mutant par génie génétique le gène codant l'enzyme qui permet la libération d'azote à partir d'éthanolamine (Fig. 4). De la même manière que pour les sucres du mucus, nous avons incubé la souche mutée et la souche non mutée dans des échantillons de CIB et nous avons observé un déficit de croissance pour la souche mutée incapable d'utiliser l'EA comme source d'azote.

**Figure 4 :** L'azote sous forme d'ammoniac est libéré à partir d'une molécule d'éthanolamine



L'enzyme « ethanolamine ammonia lyase » (EAL) catalyse la conversion de l'éthanolamine en acétaldéhyde avec libération d'azote sous forme d'ammoniac (NH<sub>3</sub>). La mutation génétique créée sur un des gènes qui code l'enzyme EAL est responsable de l'incapacité de la souche EHEC à utiliser l'éthanolamine.

Les souches EHEC semblent particulièrement bien adaptées à une utilisation spécifique de l'EA dans l'intestin grêle du bovin :

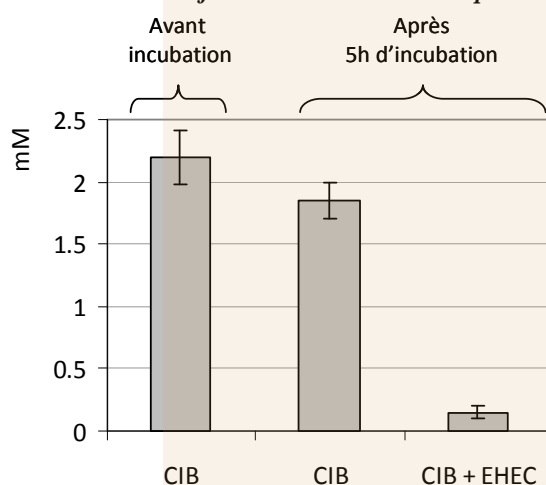
- Les enzymes nécessaires à l'assimilation de l'EA sont absents chez la majorité des bactéries du microbiote intestinal bovin (Fig. 5). Les souches EHEC étant minoritaires au sein du microbiote de l'intestine grêle, ne sont pas compétitives pour l'utilisation de nutriments facilement assimilables par l'ensemble ou une grande partie de la communauté microbienne. Les souches EHEC se sont ainsi spécialisées dans l'utilisation d'un nutriment particulier non assimilable par les autres bactéries composant le microbiote intestinal.

- L'EA a été quantifiée dans différents compartiments du tractus digestif par la technique de spectrophotométrie de masse (5). La quantité d'EA la plus importante est retrouvée

au niveau de l'intestin grêle (Fig. 6). Ainsi, dès leur entrée dans l'intestin grêle, les souches EHEC capables de résister aux conditions hostiles du rumen, disposent d'une source intéressante d'azote favorisant leur multiplication.

- Les EHEC adhèrent spécifiquement aux molécules de phosphatidyléthanolamine (PE) de la membrane des cellules intestinales alors que les autres bactéries du microbiote ne possèdent pas cette propriété. L'adhésion des EHEC aux molécules de PE provoque la mort des cellules intestinales et par conséquent la libération de fragments cellulaires dans la lumière intestinale (9). Les souches EHEC mettent ainsi en place une stratégie spécifique d'acquisition accrue d'EA car leur croissance est favorisée au contact des débris cellulaires par rapport aux autres microorganismes du microbiote intestinal.

**Figure 5 :** L'éthanolamine est majoritairement consommée par la souche EHEC

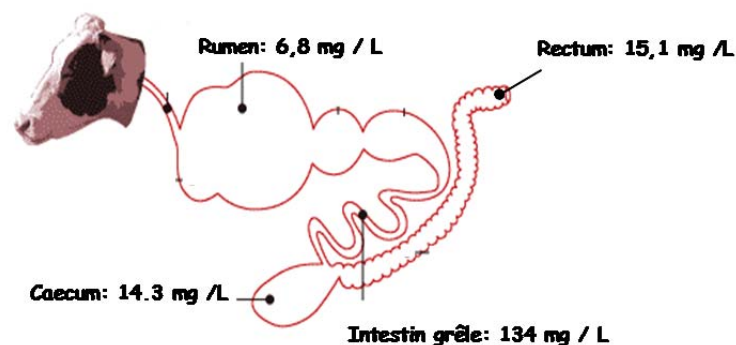


Une faible diminution (non significative) de la quantité d'EA est due à l'action des bactéries du microbiote et une disparition quasi totale de l'EA est observée en présence de la souche EHEC.

### Légende technique :

Des échantillons de CIB sont inoculés par la souche EHEC puis l'EA est quantifiée après incubation à 39°C avec un apport minimal en oxygène. L'éthanolamine est quantifiée par une technique de spectrophotométrie de masse mise au point au centre INRA de Clermont-Ferrand-Theix.

**Figure 6 : L'intestin grêle est le compartiment digestif contenant la quantité d'EA la plus importante**



## CONCLUSION

Une diminution du développement des EHEC peut être envisagée en complétant l'alimentation des animaux par des probiotiques ayant une forte affinité pour les nutriments favorisant la multiplication des EHEC dans le tube digestif de l'animal. Nos travaux ont démontré que les souches EHEC, ultra minoritaires au sein du microbiote de l'intestin grêle des bovins, se sont spécialisées dans une utilisation rapide et efficace des sucres simples issus du mucus comme sources de carbone ainsi que de l'éthanolamine comme source d'azote. Ces différents nutriments constituent une

niche écologique pour les souches EHEC et favorisent leur persistance dans l'intestin du ruminant.

Des études devront être menées pour identifier des souches probiotiques (par exemple des levures ou des bactéries lactiques) entrant en compétition avec les EHEC pour ces composés et qui ajoutées en grand nombre dans l'alimentation des bovins priveront les souches EHEC de sources de nutriments importantes. Cette compétition nutritionnelle pourra alors compromettre la survie des EHEC dans leur réservoir naturel et par conséquent réduire la contamination des aliments.

## Bibliographie

- 1] Loukiadis E, Callon H, Mazuy-Cruchadet C, Vallet V, Bidaud C, Ferré F, Giuliani L, Bouteiller L, Pihier N, Danan C. 2012. Surveillance des E.coli producteurs de shigatoxines (STEC) dans les denrées alimentaires en France (2005-2011). Bulletin épidémiologique - Santé animale, alimentation n°55. Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES).
- 2] Bibbal, D., Auvray, F., Kérourédan, M., Peytavin, C., Ferré, F., Cartier, P., Oswald, E., Gay, E., Loukiadis, E., Brugère, H. 2012. Fecal carriage of shiga toxin-producing Escherichia coli serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O145:H28 and O111:H8 in French cattle. Zoon. & Public Health S59, 12.
- 3] Chaucheyras-Durand F, Faqir F, Ameilbonne A, Rozand C, Martin C. 2006. Fates of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga toxin-producing Escherichia coli strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics. Appl Environ Microbiol. 72(6), 4136-4142.
- 4] Chaucheyras-Durand F, Madić J, Doudin F, Martin C. 2010. Biotic and abiotic factors influencing in vitro growth of Escherichia coli O157:H7 in ruminant digestive contents. Appl Environ Microbiol. 76(3), 640-647.
- 5] Bertin Y, Girardeau JP, Chaucheyras-Durand F, Lyan B, Pujos-Guillot E, Harel J, Martin. 2011. Enterohaemorrhagic Escherichia coli gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content. Environ Microbiol. 13(2), 365-377.
- 6] Bertin Y, Chaucheyras-Durand F, Robbe-Masselot C, Durand A, de la Foye A, Harel J, Cohen PS, Conway T, Forano E, Martin C. 2013. Carbohydrate utilization by enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in bovine intestinal content. Environ Microbiol. 15(2), 610-622.
- 7] Montagne L, Toullec R, Lallès JP. 2000. Calf intestinal mucin: isolation, partial characterization, and measurement in ileal digesta with an enzyme-linked immunosorbent assay. J Dairy Sci. 83(3), 507-517.
- 8] Deplancke B, Gaskins HR. 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. Am J Clin Nutr. 73(6), 1131-1141.
- 9] Barnett Foster D, Abul-Milh M, Huesca M, Lingwood CA. 2000. Enterohemorrhagic Escherichia coli induces apoptosis which augments bacterial binding and phosphatidylethanolamine exposure on the plasma membrane outer leaflet. Infect Immun. 68(6), 3108-3115.