



HAL
open science

Étude de l'adhésion des STEC aux globules gras du lait cru : une clé dans la prévention du danger STEC dans la filière lait cru et fromage au lait cru ?

Arthur Bagel

► To cite this version:

Arthur Bagel. Étude de l'adhésion des STEC aux globules gras du lait cru : une clé dans la prévention du danger STEC dans la filière lait cru et fromage au lait cru?. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10095 . tel-04270685

HAL Id: tel-04270685

<https://theses.hal.science/tel-04270685v1>

Submitted on 5 Nov 2023

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

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



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale N° 341
Évolution, écosystèmes, microbiologie, modélisation

Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 04/11/2022, par :

Arthur BAGEL

Étude de l'adhésion des STEC aux globules gras du lait cru : Une clé dans la prévention du danger STEC dans la filière lait cru et fromage au lait cru ?

Devant le jury composé de :

M. Hubert BRUGERE, Professeur, Ecole vétérinaire de Toulouse
Mme. Nathalie DESMASURES, Professeure, Université de Caen Normandie
Mme Sabine FAVRE-BONTE, Maître de Conférences, Université Claude Bernard Lyon 1
M. Gregory JUBELIN, Chargé de Recherche, INRAE
M. Jean-Yves MADEC, Directeur de Recherche, ANSES
Mme Delphine SERGENTET, Professeure, VetAgro Sup

Rapporteur
Rapporteuse
Examinatrice
Examineur
Président
Directrice de thèse

Avant-propos

Cette thèse s'inscrit dans un projet de recherche collaboratif, le projet Adhé-coli, entre VetAgro Sup, Actalia et INRAE, soutenu par le centre national interprofessionnel de l'économie laitière (CNIEL). Le projet Adhé-coli, construit en 2017, avait pour objectif de comprendre les mécanismes impliqués dans l'adhésion des *Escherichia coli* producteurs de shiga toxines (STEC) à la membrane des globules gras, la matière grasse du lait. Les travaux liés au projet Adhé-coli ainsi que ceux liés à la thèse de doctorat ont débuté en avril 2019.

Les questions de recherche de cette thèse sont directement intégrées à celles du projet Adhé-coli. Cependant, j'ai pris soin de distinguer le projet Adhé-coli de ma thèse car les questions traitées sont concentrées sur certaines questions de recherche. En effet, les axes de recherche liés à cette thèse concernent exclusivement le lait cru de vache comme modèle d'étude. Toutefois, au cours de ma thèse, j'ai pris part aux réflexions menées dans le cadre du projet Adhé-coli relatives aux modèles « fromages au lait cru » mais qui ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe Bactéries Pathogènes Opportunistes et Environnement – BPOE (UMR 5557, Lyon) à VetAgro Sup sur le campus vétérinaire situé à Marcy-L'Etoile. La grande majorité des travaux de recherche ont également été menés en collaborations avec le Laboratoire d'études des Microorganismes Alimentaires Pathogènes (LMAP)/Laboratoire National de Référence des *Escherichia coli* pathogènes, y compris les STEC (LNR STEC), adossé à l'équipe de recherche BPOE. Ce laboratoire, mandaté par la direction générale de l'alimentation (DGAL ; Ministère de l'Agriculture), est reconnu nationalement et internationalement pour son expertise sur les STEC et dispose de locaux adaptés à la manipulation de souches STEC hautement pathogènes, dont des laboratoires de sécurité de niveau 2 et 3. Pour la partie « globules gras », une partie des travaux a été réalisée en étroite collaboration avec l'unité de recherche Biopolymères, interactions, assemblages (BIA) (UR 1266, INRAE, Nantes) représentée par C. Lopez, chercheuse et experte reconnue pour ces travaux sur la matière grasse du lait cru. Dans ce contexte, certaines expérimentations ont été réalisées dans les locaux de cette unité situés sur le site de la Géraudière à Nantes.

Ce manuscrit présente le contexte de mes travaux, les expériences et les réflexions autour de la problématique et les enjeux des infections à STEC dans la filière lait cru. L'interaction de ce pathogène avec les globules gras du lait cru est envisagée comme une voie prometteuse de stratégie préventive des infections à STEC dont les options existent mais

restent cependant actuellement assez limitées. Ces travaux s'insèrent ainsi comme des travaux très préliminaires sur ces questions et tentent d'apporter de nouveaux éléments de réponses sur l'interaction STEC-globules gras et la possibilité de détourner cette interaction à des fins préventives. Ces découvertes pourraient être appliquées dans différents secteurs comme l'industrie et plus précisément la transformation du lait en fromages, la médecine préventive, voire curative (à long terme) mais également dans le domaine du diagnostic alimentaire où la matière grasse du lait cru est connue comme perturbateur de la détection des bactéries pathogènes.

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont aidé à la concrétisation et à l'aboutissement de ce travail de recherche.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Madame **Nathalie DESMASURES** et Monsieur **Hubert BRUGERE**, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapportrice et rapporteur de ce travail. Je remercie également Madame Sabine **FAVRE-BONTE** et Messieurs **Gregory JUBELIN** et **Jean-Yves MADEC** d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

Je souhaiterais remercier tout particulièrement Madame **Delphine SERGENTET**, directrice de la thèse, qui m'a épaulé et conseillé tout au long de ce travail. Je te remercie pour ton encadrement, ton écoute et ton soutien ainsi que pour le partage de ton expertise. Ces conditions réunies m'ont permis de réaliser et de concrétiser ce travail dans un cadre exemplaire. Je tiens également à remercier Monsieur **Thomas DOUËLLOU** d'avoir co-encadré le début de ce projet. Merci pour ton accueil et pour la transmission de tes connaissances qui m'ont été d'une grande aide dans ce projet. Merci sincèrement à vous deux pour la confiance que vous m'avez accordée pour mener à bien ce projet de recherche.

Je tiens à remercier Mesdames **Emmanuelle SOUBEYRAN** et **Mirelle BOSSY**, directrices de VetAgro Sup entre 2019 et 2022, et l'ensemble de la direction scientifique, d'avoir réuni toutes les conditions pour m'accueillir à VetAgro Sup et financer ma formation doctorale.

Je souhaiterais également les personnes du service sécurité sanitaire du lait du CNIEL, en particulier Mesdames **Choreh FARROKH** et **Karine LE BARILLEC**, ainsi que l'ensemble des professionnels de la filière laitière française présente dans le groupe de travail sur les bactéries pathogènes du lait. Merci d'avoir soutenu scientifiquement et financièrement le projet Adhé-coli et ce projet de thèse associé. Merci également pour les échanges scientifiques et le partage de vos expériences qui ont perfectionné les lignes conductrices du projet.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les membres du consortium du projet Adhé-coli dont je n'ai pas déjà cité les noms ; Mesdames **Christelle LOPEZ** et **Valérie MICHEL**. Je vous remercie pour votre collaboration et ces échanges scientifiques réguliers vis-à-vis de thématiques qui m'étaient initialement peu connues. Je tiens également à remercier l'unité de C. Lopez (Unité de Recherche 1266 Biopolymères, Interactions,

Assemblages, INRAE, Nantes) et Monsieur **Emmanuel JAFFRES** et son équipe (SECALIM, ONIRIS, Nantes) pour leur accueil lors de mes déplacements sur Nantes.

D'autre part, je tiens à remercier Mesdames **Nelly DUBARRY** et **Claire PRIGENT-COMBARET**, Messieurs **Frédéric AUVRAY**, **Christophe CHASSARD** et **Frédéric DELBAC** d'avoir accepté d'être membre du comité de suivi de cette thèse. Merci pour ces temps d'échange constructifs, vos encouragements et vos conseils qui ont contribué indéniablement au travail présenté ici.

Je ne pourrais pas oublier de mentionner, tous les membres de l'équipe de recherche Bactéries Pathogènes Opportunistes et Environnement – BPOE (UMR 5557) et du Laboratoire d'études des Microorganismes Alimentaires Pathogène (LMAP)/Laboratoire National de Référence des *Escherichia coli* pathogènes, y compris les STEC (LNR STEC). Merci à tous pour votre présence quotidienne au laboratoire et pour tous les moments collectifs, humains et chaleureux dont j'ai eu la chance de partager avec vous.

À ce titre, je tiens à remercier particulièrement Madame **Marion BOUVIER et les personnes de son pôle au sein du LNR STEC** pour le temps accordé à la finalisation des dernières expérimentations. Merci pour votre professionnalisme, votre détermination et votre énergie positive dont vous avez fait preuve.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel de VetAgro Sup que j'ai rencontré ainsi que les membres des plateformes scientifiques et techniques dont Mesdames **Élisabeth Errazuriz-Cerda et Adeline PAGE**. Je tiens également à remercier Monsieur **Erwan GUEGEN** pour la collaboration que nous avons initiée.

Je finirais par remercier mes proches, ma famille et mes amis, qui m'ont été d'un soutien sans faille pendant ces trois années. Merci pour votre présence, votre soutien, votre amitié et votre amour incommensurable et sincère.

Résumé

Les *Escherichia coli* producteurs de shiga toxines (STEC), responsables d'épidémies de grande envergure, impliquent souvent des aliments contaminés consommés crus ou insuffisamment cuits, comme les fromages au lait cru, la viande et les végétaux. Les mesures d'hygiène instaurées du producteur jusqu'au consommateur diminuent le risque de contamination des produits donc d'infections à STEC, mais ne l'éliminent pas entièrement. Ajouté à cela l'absence de traitement efficace contre les infections à STEC, l'intérêt du développement de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques contre ce pathogène est indéniable pour le maintien des filières et la santé des consommateurs.

Ce travail, soutenu par les professionnels de la filière laitière française, poursuit des travaux préalablement menés par l'équipe sur les propriétés anti-adhésives des globules gras du lait cru contre les STEC. La prévention de l'adhésion bactérienne est maintenant considérée comme une stratégie prometteuse pour réduire l'apparition des maladies infectieuses. Les objectifs de ce travail étaient (i) d'évaluer l'association des STEC avec les globules gras du lait cru et la réduction du niveau des STEC dans le lait cru via l'élimination de la matière grasse et (ii) d'identifier la nature de l'association STEC-globules gras et les composants moléculaires des STEC impliqués dans l'association. Pour répondre au premier objectif, une approche basée sur une propriété naturelle du lait cru, le crémage, couplée à l'imagerie et à la spectrométrie de masse, a été développée. Pour répondre au second objectif, la mesure de propriétés physico-chimiques de souches STEC telle que l'hydrophobicité et les charges de surface ainsi que l'évaluation de l'adhésion des souches aux protéines de la membrane des globules gras ont été entrepris. Afin d'évaluer l'importance de la diversité génétique et du sérotype des souches dans ce phénomène, la majeure partie des expérimentations a été réalisée sur une collection de 15 souches d'*E. coli* appartenant à plusieurs sérotypes responsables d'épidémies (O157:H7, O26:H11 et O103:H2).

Nos travaux ont démontré que toutes les souches STEC présentaient une affinité certaine pour les globules gras du lait cru, mais qu'elle différait selon les souches et le sérotype. Après avoir vérifié que les interactions aspécifiques étaient faiblement impliquées dans l'association STEC-globule gras, nous avons montré que les souches STEC O26:H11 et O103:H2 adhéraient davantage aux protéines de la membrane des globules gras, en comparaison avec les souches STEC O157:H7. Nous avons aussi démontré l'implication de protéines de surface des STEC dans leur association avec les globules gras. Par ailleurs, nous avons remarqué que la nature et la quantité des protéines exprimées par les souches étaient variables entre elles, ce qui pourrait expliquer les différences d'affinité observées entre les

souches, pour les globules gras. Concernant les acteurs moléculaires des STEC impliqués dans cette association, la flagelline (FliC) et de la porine OmpA ont été identifiés comme récepteur candidat. La caractérisation des souches STEC mutées pour ces adhésines potentielles, a mis en lumière l'implication de la flagelline dans l'adhésion des STEC aux protéines de la membrane des globules gras.

L'association bactéries-globules a très peu été étudiée du côté des bactéries. Pour la première fois, nous mettons en avant que l'adhésion STEC-globules gras semblerait impliquer une combinaison de couples récepteur/ligand, présents à la surface des STEC et ancrés dans la membrane des globules gras. Nous supposons que la spécificité du mécanisme proviendrait des différents épitopes reconnus par les STEC grâce aux différentes structures adhésives qu'elles expriment. L'identification complète des acteurs moléculaires fortement engagés dans l'association STEC-globule gras doit encore être approfondie.

Mots-clés : STEC, produits au lait cru, globules gras, membranes des globules gras (MFGM), adhésion.

Abstract

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), which are associated with large-scale outbreaks, often involve raw or undercooked contaminated food such as raw milk cheeses, meat, and vegetables. Hygiene measures implemented from producer to consumer reduce the risk of food contamination and therefore of STEC infections, but do not eliminate it entirely. The interest in developing novel preventive and therapeutic strategies against this pathotype is evident for the preservation of the food industry and the health of consumers, especially in light of the lack of relevant therapy for STEC infections.

This work, supported by the professionals of the French dairy industry, continues the work previously carried out by the team on the anti-adhesive properties of raw milk fat globules against STEC. The prevention of bacterial adhesion is now considered as a promising strategy to reduce the occurrence of infectious diseases. Thus, the goals of this work were (i) to evaluate the association of STEC with raw milk fat globules and the reduction of STEC levels in raw milk through fat removal and (ii) to identify the nature of the STEC-milk fat globule association, including the molecular components of STEC that are involved.

To address the first objective, an approach based on a raw milk characteristic, namely creaming, coupled with imaging and mass spectrometry, was developed. To address the second objective, physico-chemical characteristics of STEC strains, such as hydrophobicity and surface charges, as well as the strains' adherence to fat globule membrane proteins were measured. To evaluate the importance of genetic diversity and strain serotype in this phenomenon, most of the experiments were performed on a collection of 15 *E. coli* strains that belonged to various outbreak serotypes (O157:H7, O26:H11, and O103:H2).

Our results demonstrated that all STEC strains showed a definite affinity for raw milk fat globules, although they were variations between strains and serotypes. After verifying that aspecific interactions were weakly involved in the STEC-milk fat globule association, we showed that STEC O26:H11 and O103:H2 bacteria adhered more to milk fat globule membrane proteins, compared to STEC O157:H7 strains. We also demonstrated the involvement of STEC surface proteins in their association with milk fat globules. Furthermore, we noticed that the nature and quantity of proteins expressed by STEC were variable, which could explain the differences in affinity observed between the strains for milk fat globules. More precisely, we identified by mass spectrometry the flagellin and the OmpA porin associated with the protein fraction of the milk fat globule membrane. The involvement of flagellin in STEC

adhesion to milk fat globule membrane proteins was highlighted by studying strains that were mutated for these potential adhesins.

Bacteria-milk fat globule association has been very little studied on the bacterial side. For the first time, we propose that STEC-milk fat globule adhesion involve a combination of receptor/ligand pairs, present on the surface of STEC and anchored in the milk fat globule membrane. We assume that the specificity of the mechanism would come from the different epitopes recognized by STEC through the different adhesive structures they express. The complete identification of the molecular mechanisms strongly involved in the STEC-milk fat globule association needs to be further investigated.

Keywords: STEC, raw milk products, milk fat globules, milk fat globule membranes (MFGM), adhesion.

Sommaire

AVANT-PROPOS.....	I
REMERCIEMENTS.....	III
RESUME.....	V
ABSTRACT.....	VII
SOMMAIRE.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
SIGLES ET ABREVIATIONS	XVII
INTRODUCTION GENERALE.....	1
PARTIE 1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
CHAPITRE 1 ASSOCIATION DES STEC AVEC LES GLOBULES GRAS DU LAIT CRU.....	9
CHAPITRE 2 PATHOGENIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DES STEC.....	35
A. Généralités concernant les STEC	37
A.1. L'espèce <i>Escherichia coli</i> : du bénéfique à la pathogénicité.....	37
A.2. Définition et classification des STEC.....	38
A.3. Distinction STEC et EHEC	41
A.4. Critères de pathogénicité des STEC.....	42
B. Processus infectieux des STEC	44
B.1. Entrée et survie des STEC jusqu'à l'épithélium intestinal.....	44
B.2. L'adhésion et la multiplication des STEC	48
B.3. Multiplication des STEC	55
B.4. Libération des shiga toxines et conséquences.....	56
C. Manifestations cliniques d'une infection à STEC	60
D. Stratégies thérapeutiques des infections à STEC.....	61
CHAPITRE 3 LAIT CRU ET GLOBULES GRAS : SPECIFICITES LIEES A LA MEMBRANE BIOLOGIQUE	65
A. Le lait cru	67
A.1. Définition.....	67
A.2. Description du lait	67
A.3. Bref historique du lait cru.....	69
A.4. Traitement du lait de consommation.....	70
B. Les produits laitiers et habitudes de consommation.....	72
B.1. Du lait cru aux produits laitiers.....	72
B.2. Consommation des produits laitiers.....	73
C. Composition du lait cru.....	75

C.1. La phase aqueuse du lait cru	75
C.2. La phase colloïdale du lait cru.....	76
C.3. La phase grasse du lait cru	77
HYPOTHESES DE RECHERCHE	87
PARTIE 2 TRAVAUX EXPERIMENTAUX	89
CHAPITRE 4 AFFINITE DES STEC POUR LES GLOBULES GRAS DU LAIT CRU	91
CHAPITRE 5 INTERACTIONS ASPECIFIQUES ET SPECIFIQUES ENTRE LES STEC ET LES GLOBULES GRAS DU LAIT CRU	111
CHAPITRE 6 IMPLICATION DES PROTEINES DE SURFACE DES STEC DANS L'ASSOCIATION STEC-MFGMPs	133
PARTIE 3 DISCUSSION & PERSPECTIVES	171
CHAPITRE 7 LES RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	173
A. L'affinité des STEC pour les globules gras	174
B. Mécanismes de l'association STEC-Globules gras.....	176
CHAPITRE 8 PERSPECTIVES EXPERIMENTALES	181
A. Confirmer la nature de l'association STEC-globules gras.....	182
B. Vers un modèle plus simple que le crémage	182
C. Identifier les composants moléculaires impliqués dans l'association STEC-globules gras.....	183
C.1. Les composants des STEC	183
C.2. Composants des globules gras.....	185
C.3. Autres propriétés bactériennes et de surface	186
CHAPITRE 9 PREVENTION ET TRAITEMENTS THERAPEUTIQUES DES INFECTIONS A STEC	187
A. Les fromages au lait cru comme aliment préventif de l'adhésion des STEC à la barrière intestinale	188
B. Développement de traitements préventifs et/ou curatifs contre les STEC	190
C. Les mesures de prévention contre les STEC tout au long de la chaîne agro-alimentaire	192
C.1. Elevage.....	193
C.2. Collecte du lait	194
C.3. Transformation et distribution.	194
C.4. Consommateurs	195
CONCLUSION GENERALE.....	199
Liste des travaux liés au projet de recherche	201
A. Publications	201
B. Communications orales	201
C. Congrès.....	201
D. Rapports d'activités	202
E. Activité complémentaire	202
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	203
ANNEXES	213

Liste des figures

- Figure 1.** Cellules d'*Escherichia coli* observées par microscopie à contraste de phase (**A**) (adaptée de Tavaddod and Naderi-Manesh, 2017) ou par microscopie électronique à transmission (**B**) (adaptée de Jauffred et al., 2017). Les *E. coli* sont des bacilles (2 à 6 µm de long et 1 à 1,5 µm de large) mobiles grâce à leurs flagelles. 37
- Figure 2.** Classification des STEC selon les gènes de virulence, les sérotypes et l'origine de l'isolement de la souche (aliments ou patients). Les *Escherichia coli* sont une vaste espèce de bactéries commensales dont certaines souches peuvent être pathogènes pour l'homme, dont celles appartenant au pathotype STEC. La combinaison de la présence des gènes *stx* et *eae* ainsi que des marqueurs moléculaires relatifs à certains sérotypes (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28) est utilisé comme critère de nomenclature. En fonction de l'origine de l'isolement de la souche (aliments ou patients), la nomenclature est différente (adaptée de la Plateforme de Surveillance de la Chaîne Alimentaire, 2022). 39
- Figure 3.** Les antigènes O et H d'*Escherichia coli*. L'antigène O est porté par la partie externe du lipopolysaccharide (LPS), un composant essentiel de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif (**A** ; adaptée de Mazgaeen and Gurung, 2020). L'antigène H est porté par la flagelline qui constitue le faisceau hélicoïde du flagelle (**B** ; adaptée de Eckhard et al., 2017). 40
- Figure 4.** Ingestion de cellules STEC lors de consommation d'un aliment contaminé, son parcours à travers l'appareil digestif humain et schéma de la muqueuse intestinale et de l'estomac (adaptée de McGuckin et al., 2011). Dans l'appareil digestif, les bactéries sont piégées dans la couche supérieure de mucus, les maintenant à distance de l'épithélium intestinal. 45
- Figure 5.** Organisation anatomique et schéma histologie d'une coupe transversale du côlon (d'après Corvaisier, 2016; Université de Montpellier). Le gros intestin ou le côlon mesure entre 1 et 1,5 mètre de long pour un diamètre moyen de 7 cm. Il se compose de plusieurs zones, à savoir le caecum, le colon ascendant, le colon transverse, le colon descendant et le colon sigmoïde. Le colon absorbe l'eau et les éléments nutritifs de la nourriture digérée et fait passer les déchets (les matières fécales) dans le rectum, évacués par la suite par l'anus. 46
- Figure 6.** Franchissement du mucus par les bactéries pathogènes par dégradation enzymatique (**a**), via les cellules M qui ne sont pas recouvertes d'une épaisse couche de mucus (**b**), ou en perturbant la production de mucus par des toxines spécialisées (**c**) (adaptée de McGuckin et al., 2011). 48
- Figure 7.** Schéma des premières interactions entre une surface et une bactérie (**A**) et les structures de la surface bactérienne impliquées (**B**). Une fois la cellule bactérienne proche d'une surface, le processus d'adhésion débute. Les cellules bactériennes sont généralement chargées négativement alors que les surfaces cibles peuvent être assez diversifiées, créant un phénomène répulsif si des forces contraires sont trop importantes. A la surface cible, une couche d'eau peut agir comme une barrière à la fixation des bactéries. Les composants hydrophobes de la surface bactérienne, tels que des protéines et des polysaccharides extracellulaires, peuvent déplacer ces molécules d'eau et renforcer les interactions hydrophobes. Une fois la bactérie suffisamment proche de la surface (de l'ordre du nanomètre), les adhésines et les appendices extracellulaires des bactéries, comme les flagelles, les pili et les curli, interagissent avec la surface cible. Les adhésines fimbriales sont plus longues et peuvent s'étendre à l'échelle du micromètre (adaptée de Berne et al., 2018). 49

- Figure 8.** Lésions d'attachement/effacement (A/E) observées par microscopie électronique (**A**) et par microscopie à fluorescence (**B**). Les lésions A/E sont caractérisées par la formation d'un piédestal constitué d'actine cellulaire et la disparition des microvillosités (adaptée de Knutton et al., 1987 et Sanchez-Villamil et al., 2019, respectivement). 51
- Figure 9.** Schéma de l'adhésion des STEC aux cellules épithéliales intestinales et la formation des lésions d'attachement/effacement (A/E). Le processus d'adhésion des STEC aux cellules hôtes peut se généraliser en deux étapes : une adhésion primaire (étape 1) et une adhésion étroite conduisant aux lésions A/E (étape 3). L'adhésion étroite et spécifique des STEC engage les protéines Tir et l'intimine toutes deux codées par des gènes du LEE. Ce type d'adhésion nécessite une translocation en amont d'effecteurs bactériens dont Tir (étape 2) qui conduit aux lésions d'attachement/effacement (A/E) (étape 4). Le remodelage du cytosquelette d'actine et la formation du piédestal sont possible par l'action des effecteurs bactériens directement injectés dans le cytoplasme de la cellule hôte par le système de sécrétion de type 3. 52
- Figure 10.** Modèles schématique (**A**) et structural déterminée par cristallographie aux rayons X des shiga toxines (**B**). Les shiga toxines sont des toxines de type AB₅. La sous-unité A, composée des chaînes A1 et A2 reliées par un pont disulfure, est le domaine actif de la toxine. Les sous-unités B forment un pentamère et se lient individuellement au récepteur glycosphingolipide globotriaosylcéramide (Gb3) à la surface des cellules cibles (adaptée de Kavaliauskiene et al., 2017)..... 56
- Figure 11.** Voies potentielles de translocation de la shiga toxine à travers l'épithélium intestinal humain. Transcytose indépendante de Gb3 (**a**), transport paracellulaire pendant la transmigration des neutrophiles (PMN) (**b**), induction de l'expression de Gb3 par une infection par EHEC/STEC, transport rétrograde et libération de Stx après la mort cellulaire (**c**), translocation dépendante de Gb3 par les cellules de Paneth (**d**) et transcytose par les cellules M (**e**) (d'après Schüller, 2011)..... 58
- Figure 12.** Pathogénèse des shiga toxines. Les Stx pénètrent dans les cellules eucaryotes grâce à la sous-unité B qui reconnaît le récepteur globotriaosylcéramide (Gb3). Après son internalisation, la Stx est clivée au niveau du réticulum endoplasmique, libérant la chaîne A1 dans le cytosol. La sous-unité A1 inhibe la traduction conduisant la mort de la cellule (d'après Bhunia, 2018). 59
- Figure 13. Schéma clé.** Les grandes lignes de la pathogénie et de la physiopathologie des infections à STEC sont globalement connues mais des lacunes restent à être comblées, comme l'identification des adhésines impliquées avant l'interaction du couple Intimine/Tir, leur chronologie d'expression et leur régulation. Les mécanismes de diffusion des Stx dans la circulation systémique sont aussi encore mal compris. Le génome des STEC abrite également d'autres de facteurs de virulence, comme l'hémolysine HlyA, la protéase EspP et la catalase KatP, mais leur rôle dans la pathogénie des STEC n'est pas démontré (Brugère et al., 2012; Gouali and Weill, 2013). Nous retiendrons aussi la L-asparaginase II qui inhibe la prolifération des lymphocytes T, la cytotoxine subtilase (SubAB) ou encore le facteur d'élongation thermo-instable (EF-Tu) dont le rôle n'est pas connu (Torres et al., 2020; Tsutsuki et al., 2022)..... 63
- Figure 14.** Observation du lait cru de vache au microscope (adapté de Lopez et al., 2015) et schéma des différents constituants du lait cru. Le lait est une émulsion de type « huile dans eau » où les globules gras, la matière grasse du lait et les caséines, les protéines majeures sont dispersées dans une phase aqueuse riche en minéraux et en lactose. 68

Figure 15. Consommation des produits laitiers en France. Vente (kg/an/habitant) des produits laitiers entre 1994 et 2016 (A). Consommation (g/j) des produits laitiers entre 2003 et 2016 (B). Consommation moyenne de produit laitiers (g/j) par jour en fonction de l'âge (C) (adaptée de Charby et al., 2017).....	74
Figure 16. Globules gras dispersés dans le lait cru, distribution de taille des globules gras, schéma et image de microscopie électronique à transmission de la membrane des globules gras (adaptée de Gallier et al., 2015; Lopez et al., 2015 et Ortega-Anaya et al., 2022).	77
Figure 17. Représentation schématique de la déstabilisation de l'émulsion du lait cru. La phase aqueuse apparaît en blanc et la phase grasse/globules gras en bleu (d'après Boutonnier, 2008).....	79
Figure 18. Origine intracellulaire, croissance, transit et sécrétion des globules gras du lait (d'après Lopez, 2020)	80
Figure 19. Schéma de la MFGM (d'après Ortega-Anaya et al., 2022) et images de microscopie confocale à fluorescence montrant l'hétérogénéité structurale de la MFGM composés de microdomaines riches en glycoconjugués et des radeaux lipidiques (encart, d'après Lopez, 2020).....	82
Figure 20. Schéma clé. Spécialiste des fromages au lait cru, la France a développé une économie autour des produits laitiers, réputés bons pour la santé. Dès sa sortie du pis, le lait cru est rapidement colonisé par les microorganismes de l'environnement de la ferme, majoritairement bénéfiques ou inoffensifs pour l'homme. Dans certaines circonstances, des microorganismes pathogènes peuvent coloniser le lait. L'absence d'un traitement thermique préserve ce microbiote naturel et ces propriétés bénéfiques associées et conséquemment le risque pathogène. Par soucis de prévention, les autorités françaises recommandent aux populations à risques, en particulier les enfants de moins de cinq ans, de ne pas consommer de produits au lait cru. Produit longtemps sous-estimé, la membrane des globules gras (MFGM) est riche en macromolécules bioactives dont des glycoconjugués ayant des propriétés antiadhésives contre certains entéropathogènes. La MFGM est une source prometteuse de nouvelles molécules fonctionnelles pour l'organisme humain en particulier la santé intestinale, la nutrition infantile et la protection contre des pathogènes entériques	85
Figure 21. Propositions des mécanismes possibles d'association STEC-globules gras. Les forces aspécifiques qui s'exercent, dans les conditions physico-chimiques du lait cru, entre les STEC et les globules gras paraissent négligeables, permettant ainsi la formation de liaisons spécifiques. En effet, les globules gras et les STEC sont tous deux dispersés dans la phase aqueuse du lait grâce aux composés polaires ancrés dans leur membrane biologique. Dans les conditions physico-chimiques du lait, les charges de surface des STEC et des globules gras sont négatives et globalement de même ordre de grandeur. Les forces répulsives ainsi exercées entre la membrane des STEC et la MFGM sont faibles ; un rapprochement est alors possible. Concernant les interactions spécifiques, il semblerait que les épitopes reconnus soient de nature différente et probablement répartis de manière hétérogène à la surface de la membrane des globules gras. Aussi, le type et l'expression des structures adhésives des STEC étant différents entre les souches, la probabilité d'association est par conséquent variable. Appuyé par les données de la littérature, il est concevable que les STEC et d'autres espèces bactériennes du microbiote laitier rentrent en compétition pour les mêmes sites d'adhésion. Les STEC, et plus généralement les bactéries, pourraient aussi s'associer indirectement avec les globules gras via l'intermédiaire d'immunoglobulines. Les macromolécules associées aux globules gras jouent probablement un rôle dans la régulation génétique des STEC et dans leurs capacités d'adhésion.....	179

Figure 22. Aperçu schématique des stratégies anti-adhésives bactériennes. Le premier panneau (en haut à gauche) représente l'adhésion d'une bactérie à sa cellule hôte. Les panneaux suivants décrivent les différentes classes d'anti-adhésifs : les inhibiteurs compétitifs qui peuvent imiter les adhésines bactériennes (classe I) ou les récepteurs des cellules hôtes (classe II), les molécules qui inhibent la biosynthèse ou la présentation en surface des adhésines (classe III) ou des récepteurs de l'hôte (classe IV), et enfin, l'utilisation d'anticorps ciblant les adhésines bactériennes (classe V) (d'après Leonard et al., 2019).	191
Figure 23. Les différents maillons de la chaîne de production laitière et les moyens de maîtrise préventifs et curatifs contre les STEC. Les stratégies préventives, dont l'addition de probiotiques ou de phages contre les STEC dans l'alimentation des animaux, sont au stade de la recherche et du développement. Pour l'homme, aucun traitement préventif ou curatif spécifique aux STEC n'est disponible, à ce jour. Le développement de molécules inhibitrices des shiga toxines ou de leur action sont au cœur de la recherche en particulier via l'immunothérapie. L'utilisation de molécules inhibitrices de l'adhésion des STEC à la barrière intestinale est une voie prometteuse, de par l'absence d'effet sur la viabilité, la perméabilité membrane, la lyse cellulaire et l'expression des shiga toxines des STEC.	193
Figure 24. Préconisations concernant la prévention des infections à STEC diffusées par des autorités de santé françaises dont Santé publique France et le Ministère de santé (d'après Fila and Jones, 2022)	196
Figure 25. Communication du ministère de l'Agriculture à propos de lait consommation des produits au lait cru pour les enfants de moins de 5 ans.	197

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des souche Stx+ selon leur risque pour la santé publique en France (d'après ANSES, 2017).	42
Tableau 2. Gènes de virulence des souches STEC isolées et le risque associé de diarrhée (D), diarrhée sanglante (DS) et/ou syndrome hémolytique et urémique (SHU) (d'après FAO and WHO, 2021).....	43
Tableau 3. Déterminants moléculaires impliqués dans l'adhésion cellulaire des STEC (adapté de Ageorges et al., 2020).	53
Tableau 4. Caractéristiques physico-chimiques du lait (adapté de Boutonnier, 2008).....	69
Tableau 5. Composition d'un litre de lait de vache (adapté de Guo and Hendricks, 2008; Snappe et al., 2010). .	76
Tableau 6. Protéines majeures de la MFGM (adapté de Ortega-Anaya et al., 2022).	83

Sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique	MFGMPs	Milk fat globule membrane protéines ; Protéines de la membrane des globules gras
ADPH	Adipophiline	MUC-1	Mucin 1
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail	MUC-15	Mucine 15
AEEC	Attaching and Effacing <i>E. coli</i> ; <i>E. coli</i> attachant/effaçant	OMS	Organisation Mondiale pour la Santé
BPH	Bonnes Pratiques d'Hygiène	PAS 6/7	Periodic acid/Schiff
BTN	Butyrophiline	PC	Phosphatidylcholine
CD36	Cluster de différenciation 36	PE	Phosphatidyléthanolamine
DLC	Date limite de consommation	PI	Phosphatidylinositol
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> ; <i>Escherichia coli</i> entérohémorragique	PS	Phosphatidylsérine
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i> ; <i>E. coli</i> entéropathogène	PTT	Purpura thrombotique thrombocytopénique
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	RE	Réticulum endoplasmique
EFSA	European Food Safety Authority ; Autorité européenne de sécurité des aliments	Stx	Shiga toxine
EPS	Extracellular polymeric substance ; Substance polymère extracellulaire	STEC	Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> ; <i>Escherichia coli</i> producteurs de shiga toxines
FABP	Fatty-acid-binding proteins ; Protéines de liaison aux acides gras	SM	Sphingomyéline
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations ; Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA)	SHU	Syndrome hémolytique et urémique
Gb3	Globotriaosylcéramide	SST3	Système de sécrétion de type III
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point ; système d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques	JEMRA	The Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment
Lésions A/E	Lésions d'attachement/effacement	Tir	Translocated intimin receptor ; Récepteur transloqué de l'intimine
LPS	Lipopolysaccharide	TAG	Triacylglycérol, triacylglycérides ou triglycérides
LEE	Locus of Enterocyte Effacement ; Locus d'effacement des entérocyte	UHT	Ultra Haute Température
MAT	Microangiopathie thrombotique	XDH/XO	Xanthine déshydrogénase / oxydase
MFG	Milk fat globule ; Globule gras du lait		
MFGM	Milk fat globule membrane ; Membrane des globule gras du lait		

Introduction générale

Le risque sanitaire des aliments, qui a longtemps été perçu comme un fléau naturel, est aujourd'hui considéré comme inacceptable compte tenu des progrès sanitaires, du développement des techniques de conservation des aliments et de la mise en place de procédures de surveillance de plus en plus fines. Néanmoins, des problèmes liés à la sécurité sanitaire surviennent régulièrement, certains avec des conséquences graves sur la santé des consommateurs, comme par exemple le prion de la maladie de la vache folle et des infections liées à des bactéries pathogènes. Parmi les scandales alimentaires liés à des bactéries pathogènes survenus ces dernières années, nous pouvons citer la contamination de formules infantiles par des salmonelles commercialisées par le groupe Lactalis (DGCCRF, 2017) en 2017, des chocolats Ferrero (SPF, 2022a) en 2022 ainsi que la contamination de pizzas de la marque Buitoni (Nestlé) par *Escherichia coli* (SFP, 2022).

Plus de 200 maladies humaines d'origines bactériennes, virales, parasitaires ou liées à des toxines sont transmises par l'alimentation. À titre d'exemple, chaque année, 1 personne sur 10 dans le monde développe une infection liée à la consommation d'aliments contaminés causant près de 420 000 décès et la perte de 33 millions d'années de vie en bonne santé, selon les estimations de l'OMS (WHO, 2020). Les enfants de moins de 5 ans supportent 40% de la charge de morbidité imputable aux maladies d'origine alimentaire et 125 000 en meurent chaque année. Les maladies d'origine alimentaire se manifestent le plus souvent par une symptomatologie digestive mais également par des syndromes sévères et parfois mortels tels que la méningo-encéphalite à *Listeria monocytogenes* ou le syndrome hémolytique et urémique (SHU) consécutif à une infection à *Escherichia coli* producteurs de shiga toxines (STEC).

À mesure que la population mondiale s'accroît, l'intensification et l'industrialisation de l'agriculture et de la production animale destinées à satisfaire une demande alimentaire croissante suscitent à la fois des opportunités et des défis pour la sécurité sanitaire des aliments. Le changement climatique devrait aussi avoir une incidence en la matière, l'augmentation des températures modifiant les risques liés à la production, à l'entreposage et à la distribution des denrées alimentaires. Le fardeau des maladies d'origine alimentaire pour la santé publique, le bien-être des consommateurs et l'économie a souvent été sous-estimé du fait de la sous-notification et de la difficulté à établir des liens de cause à effet entre les contaminations des aliments et la maladie ou le décès qu'elles provoquent. Ces défis alourdissent la responsabilité qui pèse sur les producteurs et les transformateurs de denrées alimentaires à l'égard de la sécurité sanitaire des aliments.

Malgré les mesures préventives mises en place dans les filières agroalimentaires, des incidents peuvent rapidement dégénérer en urgence nationale, voire internationale étant donné la vitesse et l'étendue géographique de la distribution des produits. Au cours de la dernière décennie, tous les continents ont connu de graves flambées de maladies d'origine alimentaire, souvent amplifiées par un commerce mondialisé. La sécurité sanitaire des aliments est devenue une priorité de santé publique mondiale dans de nombreux pays, dont la France, où des moyens importants sont mis en œuvre sur l'ensemble de la chaîne de production alimentaire à travers des stratégies de surveillance, de prévention et de contrôle des dangers d'origine alimentaire. Néanmoins, ces mesures ne semblent pas suffisantes compte tenu des récentes épidémies observées et du nombre de cas humains notifiés en France. En 2020, 1010 toxi-infections alimentaires collectives¹ (TIAC) ont été déclarées en France, affectant 6 814 personnes (SPF, 2021).

Parmi les agents pathogènes responsables d'infections alimentaires, des souches particulières d'*Escherichia coli*, les *E. coli* producteurs de shiga toxines, usuellement appelées STEC pour « Shiga-toxin producing *E. coli* », sont responsables d'épidémies de grande envergure. Des épidémies liées aux STEC ont été décrites dans plusieurs pays, faisant de ce pathogène une problématique de santé publique internationale (Honish et al., 2005; Espie, 2006; Baylis, 2009; Mungai et al., 2015; Perrin et al., 2015; Currie, 2018; FAO and WHO, 2019; Treacy, 2019). Parmi les exemples les plus marquants des flambées épidémiques à STEC, l'Allemagne a connu une épidémie en 2011 suite à la contamination de pousses de fenugrec (EFSA, 2011). Des cas ont été notifiés dans 8 pays d'Europe et d'Amérique du nord, causant 53 décès. Cette épidémie liée à *E. coli* s'est soldée par 1,3 milliard de dollars de pertes pour les agriculteurs et les industriels et par 236 millions de dollars de versements d'aide d'urgence à 22 pays membres de l'Union Européenne (Yang et al., 2017). En 2022, ce pathogène a été une nouvelle fois au cœur d'une épidémie incriminant des pizzas surgelées, causant plus de 50 cas d'infections et 2 décès sur le territoire français (SPF, 2022b). Cet épisode épidémique à STEC a été reconnu par la Société Française de Pédiatrie comme l'un des plus importants en France depuis 20 ans (Fila and Jones, 2022).

Concernant les sources d'infection à STEC, les aliments incriminés peuvent être de nature différente, mais sont principalement liés à la consommation de produits carnés insuffisamment cuits et laitiers à base de lait cru ainsi que les fruits et légumes. En effet, il est

¹« Les toxi-infections alimentaires collectives ou TIAC, correspondent à l'apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire » (ANSES - Les toxi-infections alimentaires collectives, 2013).

admis que le principal réservoir des STEC est le tractus digestif des ruminants et qu'ils sont excrétés dans leurs fèces, contaminant ainsi leur environnement immédiat (Chapman et al., 2001; Álvarez-Suárez et al., 2016; McCarthy et al., 2021). Si les mesures d'hygiène sont improprement appliquées, la contamination des carcasses ou du lait cru peut se produire par contact direct entre ces matières premières et de la matière fécale, lors de la traite ou de l'abattage. Le fumier et le lisier utilisés pour fertiliser les champs agricoles participent à la dissémination environnementale des STEC dans les terres et les eaux environnantes, contaminant les fruits et légumes cultivés sur ces terres agricoles.

Les microorganismes ne résistant pas à la chaleur, l'application d'un traitement thermique de quelques minutes entre 60 °C et 100 °C (pasteurisation) ou à plus de 100 °C (stérilisation) suffisent à éliminer ce pathogène. Les infections à STEC liées à la consommation de produits laitiers impliquent le plus souvent des produits au lait cru, des produits laitiers où aucun traitement n'a été appliqué. L'attrait des consommateurs pour les produits au lait cru est associé à un gage de confiance, à la conservation des qualités nutritionnelles du produit et à leur qualité gustative différente des fromages pasteurisés (IFOP, 2021). Ainsi, la prévalence des STEC dans les produits crus, plus à risque, est surveillée annuellement par les autorités de santé publique nationales et européennes (EFSA and ECDC, 2021). En 2010, les infections à STEC d'origine alimentaire ont causé plus de 1,2 million de cas, 128 décès et près de 13 000 années de vie en bonne santé (WHO, 2015).

La problématique liée aux STEC pèse particulièrement sur la filière lait cru et fromages au lait cru. Les analyses, la destruction de lots voire le retrait/rappel de certains fromages représentent un coût financier considérable. Par exemple, en 2014, tous germes pathogènes surveillés et sur tout le département de la Savoie, environ 400 tonnes de fromages ont été détruites et 4 millions de litres de lait écartés (Syndicat Interprofessionnel du Reblochon, 2016). L'image de la filière est également écorchée lors de retraits rappels ou de TIAC. Les fromages au lait cru, potentiels vecteurs de STEC, sont des produits finis qui ont pour vocation d'être consommés tels quels. Les recommandations suggérées par les autorités compétentes telles qu'un chauffage avant consommation d'un produit à risque sont moins facilement applicables aux fromages au lait cru, contrairement à la viande. Cependant, il est important de souligner que de plus en plus de fabricants de fromages au lait cru indiquent sur leur emballage les risques liés à la consommation de leurs produits par des personnes à risque. Malgré ces messages de prévention, les recommandations ne sont pas toujours respectées. Seule l'éviction de la consommation de fromages au lait cru par les consommateurs les plus susceptibles de développer une infection pourrait faire barrage à ce danger.

Au niveau de la production, un traitement thermique (pasteurisation) ou physique (microfiltration) peut être utilisé pour éliminer tout danger présent dans le lait cru et une partie du microbiote naturel. A l'issue de ces traitements, ces produits ne correspondent alors plus à l'appellation « lait cru » et à la réglementation qui va avec. Le microbiote laitier joue un rôle fondamental dans les fromages au lait cru : il facilite la fermentation du lait, il est à l'origine de propriétés organoleptiques propres à chaque type de fromage et il favorise globalement la santé des consommateurs (Ortiz et al., 2017; García-Burgos et al., 2020). Le microbiote laitier est diversifié et complexe par nature, provenant de nombreuses sources dont le contact direct avec l'animal (trayons, peaux et fèces), la surface du matériel de traite (en particulier si les pratiques d'hygiène sont insuffisantes), le logement, la litière, l'alimentation, l'air et l'eau (Quigley et al., 2013; Machado et al., 2017; Skeie et al., 2019). Le microbiote laitier est donc spécifique à un environnement fermier et contribue au caractère unique des arômes et des saveurs des fromages au lait cru. La fabrication de fromages à partir de lait pasteurisé ou microfiltré nécessite l'addition de ferments technologiques pour équilibrer la perte des microorganismes, standardisant le produit et perdant ainsi sa singularité. La plupart du temps des ferments lactiques sont également ajoutés au lait cru lors de la fabrication de fromages au lait cru, mais une base variable de microorganismes reste présente. De plus, d'autres composants du lait cru sont aussi modifiés sous l'action d'un traitement thermique, impactant les propriétés nutritionnelles du produit fini (Lopez, 2005; Raikos, 2010; Aalaei et al., 2019) et accentuant ainsi la différence entre les fromages au lait cru et pasteurisés.

Dans ce contexte sanitaire, l'avenir des fromages au lait cru reste incertain et l'assurance d'une sécurité sanitaire optimale de ces produits dépend de la vigilance de la filière et de sa mobilisation ainsi que celle des autorités publiques. En France, les autorités compétentes ainsi que les scientifiques reconnaissent l'importance du fromage au lait cru tant en termes de patrimoine gastronomique que de développement socio-économique régional et national. Les infections d'origine alimentaire sont des maladies que l'on peut traiter pour certaines et surtout prévenir. Les autorités et les scientifiques soutiennent ainsi l'ensemble des filières agroalimentaires concernées en :

- Améliorant les connaissances scientifiques sur l'écologie des STEC,
- Développant des méthodes de maîtrise et de surveillance de ces bactéries de la ferme à la fourchette,
- Comprenant davantage la circulation et la transmission des STEC au sein des élevages,
- Affinant la cartographie des étapes à risques de contamination des matrices alimentaires sur la chaîne de production alimentaire,

- Développant de nouvelles stratégies d'élimination des STEC dans les matrices contaminées tout en minimisant l'impact sur le produit.

Le projet de recherche Adhé-coli dans lequel mes travaux de thèse sont intégrés a en partie été financé par le Centre national interprofessionnel de l'économie laitière (CNIEL), une interprofession qui regroupe les acteurs de la filière laitière française et qui a pour vocation d'organiser l'économie laitière de façon cohérente pour favoriser le développement économique du secteur. Le soutien de ces travaux par le CNIEL traduit l'importance d'enrichir les connaissances des STEC pour la filière laitière.

En ce qui concerne la pathogénicité des STEC, la liste des facteurs de virulence et des mécanismes impliqués n'est pas encore totalement connue. Les shiga toxines (Stx) sont des toxines bactériennes qui constituent le facteur de virulence déterministe du pathotype STEC. La libération des shiga toxines dans l'organisme humain peut conduire à de graves symptômes en particulier chez les enfants, susceptibles de développer des syndromes hémolytiques et urémique (SHU) et d'induire des défaillances rénales et/ou cérébrales sur plusieurs années et dans certains cas, le décès du patient.

Même si les shiga toxines sont des facteurs de virulence *sine qua non* des STEC, des propriétés complémentaires, comme la capacité à adhérer à l'épithélium intestinal et à coloniser l'intestin, sont indispensables pour initier leur processus infectieux. Pour coloniser efficacement leur hôte et provoquer des symptômes, les bactéries pathogènes ont développé de nombreuses stratégies moléculaires pour adhérer aux cellules de l'hôte (Ofek et al., 2003; Nataro and Jansen, 2005). La plupart des souches STEC responsables d'infection portent plusieurs gènes codant pour des adhésines, des protéines membranaires spécialisées dans l'adhésion. On peut notamment citer les gènes *eae*, *toxB* (gène plasmidique), *efa1*, *iha*, *cah*, *ompA* ainsi que des gènes impliqués dans la biosynthèse de structures extracellulaires plus complexes comme les fimbriae ou les flagelles.

L'adhésion est nécessaire aux bactéries afin qu'elles ne soient pas éliminées par les mécanismes naturels de défense de l'hôte. En conséquence, la prévention de l'adhésion bactérienne est maintenant considérée comme une stratégie prometteuse pour réduire l'apparition des maladies infectieuses. Plusieurs approches spécifiques ont été envisagées, notamment l'inhibition de l'adhésion des pathogènes par des récepteurs analogues de ceux reconnus par la bactérie à la surface des cellules cibles. Il est connu que certains composés alimentaires sont capables d'inhiber l'adhésion de bactéries pathogènes aux entérocytes (Quintero, 2011; Quintero-Villegas et al., 2013). Parmi les aliments connus pour contenir des molécules préventives contre les agents infectieux, le lait cru est considéré depuis longtemps

comme un aliment à fort potentiel. Le lait cru est un fluide biologique complexe, nutritif et riche en protéines.

La stimulation positive et la protection de l'organisme humain par les composants du lait cru ne sont pas totalement connues. Néanmoins, une part importante serait attribuable aux composants protéiques et lipidiques associés à la matière grasse du lait cru. La matière grasse du lait cru est majoritairement présente sous la forme de petites gouttelettes lipidiques, appelées « globules gras du lait cru » (MFGs ; *milk fat globules*). Les MFGs sont entourés d'une membrane biologique, la membrane des globules gras du lait (MFGM ; *milk fat globule membrane*) où sont ancrées une grande diversité de glycoconjugués, des protéines et des lipides associés à des résidus sucrés. Plusieurs de ces glycoconjugués présentent des propriétés anti-adhésives contre des agents pathogènes, y compris des pathotypes d'*Escherichia coli*. Cependant, très peu de travaux ont étudié l'adhésion des STEC aux glycoconjugués de la MFGM du lait cru et des fromages au lait cru. **Dans ce contexte, l'association des STEC avec les globules gras du lait cru de vache, l'implication et l'identification des protéines de surface bactériennes ont été les principaux axes de recherche de ce projet. Aussi, ces travaux ont évalué les pistes potentielles de cette association comme outil de prévention contre les STEC. Ce manuscrit s'articule donc autour de deux éléments centraux : les STEC et les MFGs (ainsi que leur association).**

Dans une première partie, les connaissances scientifiques actuelles sur l'association STEC-MFGs sont présentées, sous forme d'une revue bibliographique. Un deuxième chapitre se focalise plus en détails sur (1) la pathogénie et la physiopathologie des infections à STEC et (2) le lait cru, les globules gras du lait cru et les spécificités liées à sa membrane biologique. **Dans une deuxième partie**, les travaux expérimentaux menés dans le cadre de ce projet de recherche sont présentés. Cette partie est composée de trois chapitres, présentés sous formes de publications. La première publication présente les travaux menés sur l'effet des souches et du sérotype sur l'affinité des STEC aux globules gras du lait cru bovin. L'utilisation du crémage comme méthode de réduction des STEC du lait cru est également discutée. La deuxième publication porte sur l'évaluation des capacités d'adhésion des STEC pour les protéines de la membrane des globules gras. L'effet souche et sérotype a été étudié ainsi que l'identification de protéines bactériennes potentiellement impliquées dans l'adhésion. La troisième publication se focalise davantage sur la spécificité du mécanisme de l'association STEC-globules gras à travers trois souches modèles. L'implication des protéines de surface des STEC dans le phénomène a été étudié. **Une troisième et dernière partie** discute des résultats obtenus et conclut ce projet de recherche, et aborde aussi ses perspectives.

Partie 1

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1. Association des STEC avec les globules gras du lait cru.....	9
Chapitre 2. Pathogénie et physiopathologie des STEC.....	35
Chapitre 3. Lait cru et globules gras : spécificités liées à la membrane biologique.....	65

Chapitre 1

**Association des STEC
avec les globules
gras du lait cru**

Revue de la littérature

Bagel, A. & Sergentet, D., 2022, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Milk Fat Globules. *Microorganisms* 10, 496



Review

Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Milk Fat Globules

Arthur Bagel¹ and Delphine Sergentet^{1,2,*}

¹ 'Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment' Research Team, Université de Lyon, UMR5557 Ecologie Microbienne Lyon, CNRS (National Center of Scientific Research), VetAgro Sup, Marcy-l'Étoile, 69280 Lyon, France; arthur.bagel@vetagro-sup.fr

² Laboratoire d'Études des Microorganismes Alimentaires Pathogènes-French National Reference Laboratory for *Escherichia coli* Including Shiga Toxin-Producing *E. coli* (NRL-STEC), VetAgro Sup—Campus Vétérinaire, Université de Lyon, Marcy-l'Étoile, 69280 Lyon, France

* Correspondence: delphine.sergentet@vetagro-sup.fr

Abstract: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are zoonotic Gram-negative bacteria. While raw milk cheese consumption is healthful, contamination with pathogens such as STEC can occur due to poor hygiene practices at the farm level. STEC infections cause mild to serious symptoms in humans. The raw milk cheese-making process concentrates certain milk macromolecules such as proteins and milk fat globules (MFGs), allowing the intrinsic beneficial and pathogenic microflora to continue to thrive. MFGs are surrounded by a biological membrane, the milk fat globule membrane (MFGM), which has a globally positive health effect, including inhibition of pathogen adhesion. In this review, we provide an update on the adhesion between STEC and raw MFGs and highlight the consequences of this interaction in terms of food safety, pathogen detection, and therapeutic development.

Keywords: STEC; MFGM; raw milk cheese; anti-adhesion strategy



Citation: Bagel, A.; Sergentet, D. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Milk Fat Globules. *Microorganisms* **2022**, *10*, 496. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030496>

Academic Editor: Claudia Picozzi

Received: 14 January 2022

Accepted: 17 February 2022

Published: 23 February 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In the Code of Hygienic Practice for Milk and Milk Products (Codex Alimentarius, 2004), raw milk is defined as milk that has not been heated beyond 40 °C or undergone any treatment that has an equivalent effect. Raw milk is an oil-in-water type emulsion and contains almost 900 g of water and 130 g of dry matter, in varying proportions [1]. Milk is a major source of calcium, and also an important supply of proteins, for those who consume it (newborn mammals and humans). Milk contains all essential amino acids, lipids, fatty acids, vitamins, and lactose [2]. One liter of whole milk contains approximately 38 g of fat, which is present mainly in the form of milk fat globules (MFGs) [3].

Raw milk cheeses are made from raw cow, sheep, or goat milk. Different cheese-making processes can be applied to create the end-products. The various combinations of ingredients (such as milk and cultures) and cheese-making processes result in a large diversity of cheeses. No less than 1200 different cheeses are made in France [4]. These include ripened or unripened soft, semi-hard, hard, or extra-hard products, which may be coated, uncooked, or cooked pressed cheeses (with short or long ripening), blue-type cheeses, lactic cheeses, and white mold cheeses.

Raw milk is unstable due to the presence of microflora and, therefore, is often treated to optimize its conservation and to prevent microbiological hazards. The microbiota of raw milk is complex and is derived from many sources, including direct contact with the animal (teats, hides, and feces), the surface of milking equipment (particularly if hygiene practices are poor), housing, bedding, feed, air, and water [5–7]. On the one hand, this dynamic bacterial community plays several beneficial roles in subsequent dairy products such as facilitating fermentation and promoting the health of consumers. On the other hand, microbiota can contain spoilage or pathogenic bacteria [5]. The milk microbiota is almost eliminated during heat treatment, such as ultra-high temperature (UHT) sterilization, and microfiltration, while in raw milk the microbiota is preserved. Different studies have shown

that the raw milk microbiota is useful to the human digestive system; therefore, it may be beneficial to preserve it [5,8]. In addition, the raw milk microbiota gives raw milk cheeses more varied and intense flavors than heat-treated milk cheeses. The raw milk microbiota can also influence the human intestinal microbiota, which contributes significantly to human health, for example, by modulating the immune system. The consumption of raw milk and raw milk cheeses can also reduce blood pressure in people with mild to moderate hypertension [9] and decrease allergies in infants [10,11]. However, the risk–benefit ratio of consuming raw milk products is difficult to estimate. Nevertheless, in France, it is strongly recommended to avoid giving raw milk products to children under 5 years old, pregnant women, and immunocompromised patients [12]. If poor hygiene procedures have been applied, particularly during milking, raw milk may be contaminated by pathogenic bacteria such as Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC).

STEC are foodborne zoonotic bacteria associated with large-scale epidemics that represent a major public health problem. Human STEC infection is most often linked to the ingestion of contaminated food and water, such as undercooked ground meat, raw milk cheeses, or raw vegetables. Raw milk and raw milk cheeses have been linked to foodborne infections associated with STEC in humans from different countries [13–20]. Ruminants are the primary reservoir of STEC. Milk is most often contaminated by feces (directly or indirectly) during the milking process. STEC are very frequently associated with severe forms of infection such as hemorrhagic colitis and, in very severe cases, systemic complications including hemolytic uremic syndrome (HUS). HUS is the leading cause of renal failure in children under 3 years of age. The estimated infectious dose is very low: between 5 and 50 viable cells [21,22].

The proportion of milk and dairy products involved in Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) notifications issued due to food contamination with STEC is very low compared to those involving meat products [23]. The RASFF is a European communication tool used when public health microbiological hazards are detected in the food chain and food products. In 2013, two RASFF notifications were related to STEC-contaminated dairy products versus 68 for meat products. In 2014, four RASFF notifications of dairy products contaminated with STEC were listed, compared with 53 for meat products. Likewise, there were 7 versus 16, 8 versus 26, and 4 versus 49 dairy-related and meat-related notifications, respectively, in 2015, 2016, and 2017 [23]. Furthermore, epidemiological studies have shown that this class of product is only a minor source of human enteric infection [24–26]. Interestingly, prevalence data on these enteropathogens in dairy matrices and ingestion-related outbreaks do not fit overall foodborne-related outbreak figures [26]. A study led by Douëllou et al. [27] showed that there were no differences in the key virulence properties of dairy STEC isolates compared with human isolates. The same authors hypothesized that this phenomenon might be related to an association between STEC and MFGs, thus inhibiting STEC adhesion to enterocytes.

Milk fat globules (MFGs) have a positive impact on the immune system, and their antimicrobial properties have been largely described [28–31]. The positive action of MFGs on human health seems to be carried out by the membrane (and membrane components) surrounding the globules. MFGs are small lipid droplets formed by a core of triacylglycerols (TAGs) and enveloped by a biological phospholipid triple membrane, the milk fat globule membrane (MFGM), which is derived from mammary epithelial cells [32]. The outer bilayer of the MFGM contains diverse (glyco)-proteins and (glyco)-lipids on its surface [33]. These glycoconjugates make up the glycocalyx and act as a source of specific bacterial and viral ligands [29,34].

The objective of this review is to provide an update on the interaction between STEC and raw MFGs and to highlight the implications of this interaction. First, we will review the impact of STEC in the raw milk sector. Then, we will review the mechanisms of association between STEC and fat globules. We will conclude with the beneficial and detrimental consequences of this association.

2. Raw Milk Sector and STEC

2.1. Importance of Raw Milk Cheeses

Cheeses are products with high added value and significant economic importance in France and Europe. In 2019, the annual cheese consumption per inhabitant was 26.8 kg in France and 19.1 kg in all of Europe [35]. In total, 10,630,000 t of cheese were produced in Europe in 2019 [35]. In France, cheeses represent one of the main food industries, worth approximately EUR 38.7 billion in 2017 [36]. In 2019, with all milk processing combined, French cheese production included 1,664,632 t of cow's milk cheese, 99,265 t of goat's milk cheese, and 59,638 t of sheep's milk cheese [35]. The production of raw milk cheese accounted for 172,128 t of the cow's milk cheese, 20,872 t of the sheep's milk cheese, and 9691 t of the goat's milk cheese produced in France in 2019 [35]. Raw milk cheeses represent the vast majority of farmhouse dairy products and approximately 75% of the volume of cheeses marketed under quality and origin identification signs (SIQO), including protected designations of origin (PDO) and protected geographical indications (PGI). Finally, a study has shown that 75% of French people consume raw milk cheeses at least once a month and that 33% of French people consume raw milk cheeses every week [37]. In contrast, no data on the worldwide consumption or production of raw milk cheeses are currently available.

Raw milk cheeses are part of French and European food heritage and are an essential tool to enhance product value and to create dynamism in our territories. They are part of a dynamic of rural development and land use planning; their production avoids the desertification of certain areas by providing a significant source of income for farmers. They are often produced under a PDO quality label. Raw milk cheeses encourage variety and diversification of production and contribute to the sustainability of rural economies. They protect traditional production areas, enhance the recognized know-how of operators, and facilitate, especially for small producers, the marketing of differentiated products with specific and clearly identifiable characteristics. In France, the competent authorities as well as scientists recognize the importance of raw milk cheese both in terms of gastronomic heritage and regional socio-economic development. At the same time, authorities and scientists seek to support the industry by improving scientific knowledge about STEC and developing methods for the control and surveillance of this bacteria from farm to fork.

2.2. STEC

STEC are foodborne zoonotic bacteria associated with large-scale epidemics that represent a major public health problem. Ruminants (cattle, buffalo, goats, and sheep) are the main reservoir of STEC [38,39]. Infected ruminants can be asymptomatic, harboring the bacteria in their gastrointestinal tract and shedding bacteria in their feces [40–42]. Detailed investigations have shown that without proper cleaning methods and udder hygiene practices, feces can contaminate the teats and udders of animals and cause milk contamination during milking [43]. When STEC-contaminated milk is used to produce raw milk cheeses, STEC can survive and be isolated in some cheeses.

The pathogenesis of STEC-related disease generally involves three phases: (i) ingestion of contaminated food; (ii) colonization of the intestinal epithelium by STEC; and (iii) production of Shiga toxins (Stx) that disrupt normal cellular functions and damage cells. Stx are the main virulence factors of STEC. The Stx family includes all toxins with a similar structure and biological activity. Based on their different *in vitro* and *in vivo* toxicity, amino acid sequences, or nucleotide sequences of the *stx* genes, two major types of Shiga toxins, Stx1 and Stx2, and numerous variants (Stx1a to Stx1d and Stx2a to Stx2k) have been identified [44–47]. To effectively colonize a host and cause disease, STEC have evolved mechanisms and strategies for attaching or adhering to host cells and tissues [48]. Adhesion is required so that STEC cells are not swept away by the host's natural self-cleaning mechanisms. An arsenal of STEC surface adhesion factors have been described (Figure 1).

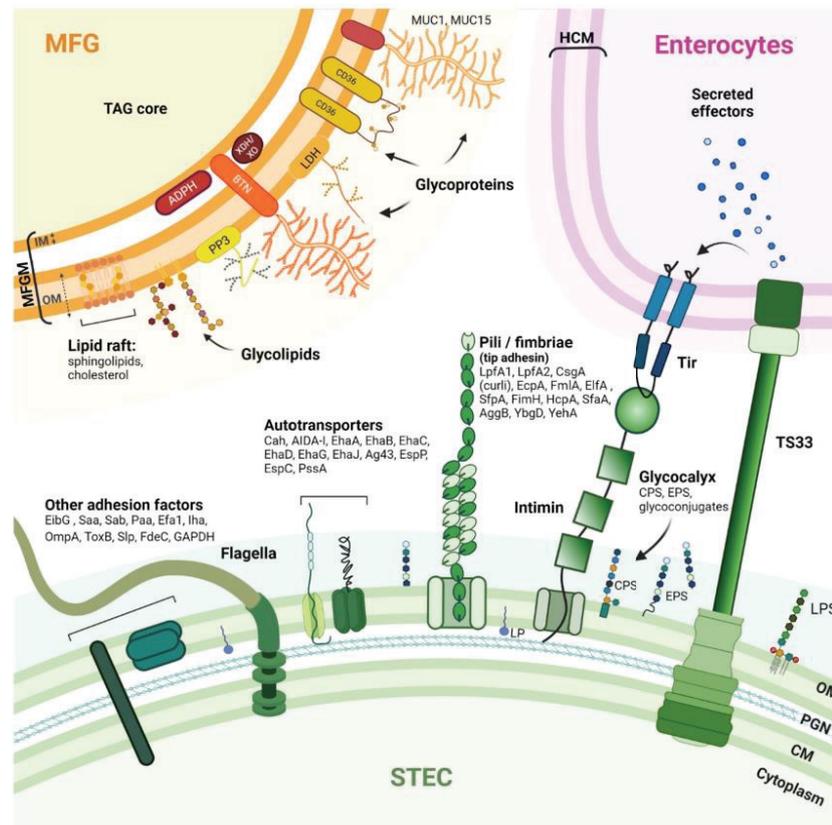


Figure 1. Schematic drawing of STEC adhesion factors and the bovine MFGM. STEC have an arsenal of protein structures involved in host cell adhesion. However, the adhesion mechanisms that contribute to the pathogenicity of STEC are not fully understood, and the receptors recognized by these adhesion factors are not all known. Nevertheless, some pili, autotransporters, and flagella can bind to host extracellular matrix (ECM) components such as fibronectin and laminin (glycoproteins). The MFGM is a complex trilayered structure, comprising a monolayer of polar lipids derived from endoplasmic reticulum (IM: inner membrane) and a bilayer of polar lipids originating from the apical plasma membrane of mammary secretory cells (OM: outer membrane). The structures drawn do not necessarily reflect the actual structures of the macromolecules and are not to scale. CM: Cytoplasmic membrane; PGN: Peptidoglycan; OM: Outer membrane; LPS: Lipopolysaccharide; LP: Lipoprotein; Tir: Translocated intimin receptor; T3SS: Type 3 secretion system; HCM: Host cytoplasmic membrane; CPS: Capsular polysaccharide; EPS: Extracellular polysaccharide; LpFA: Long polar fimbria subunit A; CsgA: Major curlin subunit; EcpA: *E. coli* common pilus subunit A; FmlA: Type-1 fimbria subunit A; EfaA: laminin-binding fimbria subunit A; SfpA: sorbitol-fermenting fimbria subunit A; FimH: Type 1 fimbria D-mannose specific adhesin; HcpA: Hemorrhagic coli pilus subunit A; SfaA: S-fimbria subunit A; AggB: Aggregative adherence fimbria I subunit B; YbgD: Putative fimbria Ybg subunit A; YehA: Putative fimbria Yeh subunit A; Cah: Calcium-binding antigen 43 homologue; AIDA-I: Adhesin

involved in diffuse adherence; Eha: Enterohaemorrhagic *E. coli* autotransporter; Ag43: Antigen 43; EspP: Extracellular serine protease plasmid encoded; EspC: EPEC-secreted protein C; PssA: Protease secreted by STEC; EibG: *E. coli* immunoglobulin-binding protein G; Saa: STEC autoagglutinating adhesion autotransporter; Sab: STEC autotransporter contributing to biofilm formation; Paa: porcine A/E-associated protein; Efa1: EHEC factor for adherence; Iha: IrgA homologue adhesin; OmpA: Outer membrane protein A; ToxB: Toxin B; Slp: Carbon starvation-inducible lipoprotein; FdeC: Factor adherence *E. coli*; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. MUC1/MUC15: Mucin 1/15; LDH: Lactadherin; ADPH: Adipophilin; BTN: Butyrophilin; XDH/XO: Xanthine dehydrogenase/oxidase; CD36: Cluster of differentiation 36; PP3: Proteose peptone 3; TAG: triacylglycerols.

The ability to adhere to the intestinal epithelium and colonize the intestine undeniably contributes to the pathogenic processes of STEC cells. Thus, the vast majority of clinical isolates known to cause bloody diarrhea or HUS have one or more virulence factors that allow their adhesion to intestinal epithelial cells [44]. The major adhesion factor of clinical STEC isolates is intimin [49], a protein encoded by the *eae* gene that resides in the locus of an enterocyte effacement pathogenicity island (LEE). The pathophysiology of clinical isolates possessing the *eae* gene is characterized by the development of enterocyte attachment-effacement (A/E) lesions. These lesions are responsible for the diarrhea observed in patients [49]. Intimin attachment to the host cell requires an upstream connection of the STEC cell to the host cell cytoplasm [48]. Intimin binds to the translocated intimin receptor (Tir) protein, which is encoded by STEC and translocated into the host cell cytoplasm using a type III secretion system (T3SS) and then inserted into the host cell membrane. Although STEC isolates carrying the *eae* gene represent the vast majority of human infections, some STEC lacking the *eae* gene have been isolated from patients [50,51]. An early adhesion phase involving other adhesion factors may occur before, or in parallel with, the formation of the highly specific intimin/Tir bond. Intimin can also bind, with less specificity and strength, to certain host cell surface components such as integrin and nucleolin, and this may contribute to STEC–host cell adhesion [52–54]. Some studies suggest involvement of the long polar fimbriae (LPF), which recognizes moieties of eukaryotic extracellular matrix (ECM) components [55,56]. Molecular characterization studies of STEC isolates have also identified *paa*, *efa1*, *ompA*, *saa*, *sab*, *toxB*, and *aggR* as genes encoding virulence factors involved in adhesion [57–59]. Flagella are also involved in STEC adhesion by binding to mucus and mucin proteins [60]. Other proteins can interact with immunoglobulins, for example, *E. coli* immunoglobulin-binding protein (Eib) [61,62]. The complete list of virulence factors, the timing of their expression, and the mechanisms involved in STEC pathogenicity are not yet fully known. Current knowledge of STEC surface proteins is summarized in Figure 1. STEC adhesion mechanisms are further detailed in these articles: [48,59,63].

2.3. Milk Fat Globules

MFGs can be distinguished from other forms of fat by the milk fat globule membrane (MFGM) that surrounds a core of triacylglycerols (TAGs) (Figure 1). Complex fat supramolecular organizations are also found in egg yolk or oilseeds in the form of oleosomes [64]. The MFGM is made of phospho- and sphingolipids, cholesterol, and proteins [65,66]. As a consequence of the mechanism of milk fat secretion from mammary epithelial cells, the MFGM is a complex trilayered structure, comprising a monolayer of polar lipids derived from the endoplasmic reticulum and a bilayer of polar lipids originating from the apical plasma membrane of the mammary secretory cells [67–69]. The MFG size is dependent on the origin of the milk. Bovine MFGs have a mean diameter of 4 μm , while MFGs from goat (3.19 μm), camel (2.99 μm), and sheep raw milk (3.78 μm) are all smaller, and MFGs from buffalo (8.7 μm) are much larger [70]. The main MFGM (glyco)-proteins include glycoproteins mucin 1 and 15 (MUC1; MUC15), the redox enzyme xanthine dehydrogenase/oxidase (XDH/XO), butyrophilin (BTN), cluster of differentiation 36 (CD36), lactadherin (LDH); and two proteins: adipophilin (ADPH) and fatty-acid binding protein

(FABP) [29,71]. For a more complete description of MFGs and MFGM, we refer the reader to these articles: [69,72,73].

3. STEC in Raw Milk Cheeses

3.1. Prevalence and Behavior of STEC in Raw Milk Cheeses

The most comprehensive studies on the prevalence of STEC in cheeses have been conducted in Europe and show that the prevalence of STEC varies from 0% to 13.1%, depending on the study [74]. In France in 2009, 2014, and 2018, surveillance plans assessed the prevalence of specific STEC isolates (*E. coli* possessing the *eae* and *stx* genes and belonging to O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 serotypes) in raw milk cheeses. These studies showed a prevalence of 0.9%, 0.2%, and 0.8% in the raw milk cheese studied in 2009, 2014, and 2018, respectively. In 2016, researchers in a French study evaluated the genetic diversity and virulence gene profiles of STEC isolated from dairy products [27]. They showed that the 197 studied isolates displayed a high genetic diversity regardless of their serotype, with Simpson's Diversity Index ranging from 1.0 to 0.9615. In addition, their results suggested that the virulence gene profiles of the dairy isolates are a potential hazard. Nevertheless, for the isolate most frequently found in dairy products, O26:H11 STEC, gene expression was similar between human and dairy isolates except for *stx1* (44% vs. 87%) and *stx2* (81% vs. 23%) expression. It is important to keep in mind that *Stx2* has stronger cytotoxicity than *Stx1* [75]. A French team showed that during the manufacture of different types of cheese experimentally contaminated with STEC strains, there was no statistically significant strain effect for the same serotype [76,77]. However, only a few different strains were tested for each serotype. Interestingly, a serotype effect was observed in certain types of cheese. Researchers observed less growth of the serotype O157:H7 strains than of the serotype O26:H11, O103:H2, and O145:H28 strains. They hypothesized that strains belonging to serotypes O26:H11, O103:H2, and O145:H28 could be more adapted to the conditions (physicochemical parameters and microbiota) encountered in cheeses.

3.2. Impact of Cheese-Making Parameters on STEC and MFGs

The different processing steps applied and the origin of the raw milk used (e.g., cow, buffalo, goat, or sheep) can influence the behavior and survival of STEC [76]. The behavior of STEC (survival, growth, or inactivation) can also be influenced by temperature and by the intrinsic physicochemical properties (pH, a_w , and % lactic acid) of, and the other microflora present in, the raw milk microbiota and added starters used in different cheeses during their manufacture. At the initial stages of cheese-making, the temperature (around 30 °C) and a_w value of milk provide favorable conditions for the growth of STEC and an increase in STEC level by 1–3 log CFU/g can occur [76,77]. Then, the rapid acidification (pH > 4.3) encountered during the manufacture of certain cheeses can reduce STEC cell counts by 1–4 log CFU/g, depending on the STEC serotype and the type of cheese [76,78]. Various studies have shown that when ripening is long and, therefore, the a_w is low, STEC numbers decrease [76]. Nevertheless, while ripening can reduce the number of STEC cells, it cannot ensure the safety of the product if the raw milk is contaminated with STEC [79,80]. The environmental conditions during cheese processing generate stress for STEC, which can affect gene expression. Although little is known about the physiological state of STEC in cheese at different stages of production, it has been shown that the cheese-making process can trigger the production of *Stx* phages [81].

The various milk treatments for cheese processing also impact MFG and MFGM integrity and, consequently, the molecules involved in the MFGM–bacteria association [29,82]. Such treatments include high-temperature treatments [83,84], homogenization, and enzymatic reactions [85]. One must keep in mind that for raw milk cheeses, the curd is never heated above 54 °C. Heat treatments that kill or limit bacterial growth can also damage heat-sensitive compounds, such as glycoconjugates and associated oligosaccharides, located on the MFGM surface. Carbohydrate epitopes are well-known targets of bacte-

rial adhesion [86]. Homogenization reduces the diameter of MFGs (ranging from 0.1 to 0.5 μm [82]) and increases the total MFGM surface area available to bacteria. Furthermore, homogenization can alter MFGM composition [84,85,87]. Treatments applied during cheese production may also alter the environment and the ability of STEC to adhere to the MFGM. In addition, physical forces applied in some cheese processing (e.g., pressed cheeses) can lead to detachment of the MFGM and their dispersion either in the product or in the whey, which will be eliminated. Nevertheless, glycoconjugates may remain intact through to end-consumption in non-pasteurized dairy products.

3.3. Location of STEC in Raw Milk Cheeses

Douëllou et al. used epifluorescence microscopy and a specific antibody coupled to FITC to assess bovine raw milk and concluded that both STEC strains assayed were localized near MFGs [88]. A natural raw milk creaming saturation assay with STEC revealed a strain-dependent tropism for the bovine raw milk cream layer and a distinct half-saturation point ($8.5\text{--}9 \log_{10} \text{CFU.mL}^{-1}$). Similar observations were presented by Brewster and Paul, suggesting that the cream layer exhibits a high capacity for *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* [89]. Bacterial purification from milk by creaming seems to be not species-specific but rather general to bacteria.

The discrimination of specific bacteria in a complex product, such as raw milk cheese, is a true challenge. Furthermore, due to the modifications to milk and the MFG structure that occur during the cheese-making process, bacterial localization can vary. At the macroscopic scale, Miszczycha et al. showed that in experimentally inoculated cheeses, the levels of STEC strains belonging to serotypes O103:H2 and O145:H28 were statistically similar in the core and in the rind, regardless of the ripening conditions (traditional or industrial) [76]. The levels of serotype O26:H11 were also statistically similar in the rind. Bacterial localization in raw milk cheese has also been realized by morphologic observation on electronic micrographs [90–93] or by nonspecific DNA staining and assessment by fluorescent microscopy [90,94,95]. One study observed fluorescent mCherry-tagged *Lactobacillus reuteri* in raw milk [96]. However, to the authors' knowledge, no study focusing on the localization of STEC or other pathogenic bacteria during the cheese production process has been published.

At the microscopic scale, the localization of bacteria in other dairy products, such as fermented milk, is poorly documented. Overall, few studies have focused on the localization of STEC in dairy products. More work is needed to understand STEC behavior in raw milk cheeses and their interaction with MFGs. Based on the available literature describing other bacteria [95,97,98], STEC could potentially localize near MFGs, in serum pockets, or the protein network.

4. The Mechanism of STEC-MFG Association: What Do We Know?

4.1. General Information on Bacterial Adhesion

Bacterial adhesion is a complex process involving several factors, including: (i) surface-related properties (hydrophobicity, electrical charge, roughness, and topology); (ii) cell morphological properties (size, volume, dimension, and shape); (iii) the cell surface (chemical properties, envelope type, exposed proteins, and exopolysaccharide (EPS)); and (iv) the cell's ability to move [99]. Adhesion is a key step for bacteria (pathogenic or not), allowing colonization and growth at a host-specific site [100]. The bacterial adhesion process consists of two phases: a non-specific phase, involving physicochemical bonds, and a specific phase involving molecular factors exposed on both host and bacterial cell surface [101]. The STEC–MFG association can be seen as a host–bacteria adhesion facilitated by the origin of the MFGM and its similarities with the membrane of intestinal cells [29,68]. In this context, both biological membranes will interact together through surface components. Various glycoconjugates are anchored on the MFGM surface (Figure 2) and can act as ligands.

4.2. Physicochemical Interactions

Non-specific interactions have been described as the first step of adhesion, which is reversible and occurs rapidly (in the order of ~1 min) [102]. The process of initial bacterial adhesion is still not clearly understood, and physicians and microbiologists are working together to clarify the mechanisms. It is widely accepted that bacterial interaction is conducted according to the Derjaguin, Landau, Verwey, and Overbeek (DLVO) theory [103] and the extended DLVO theory [104]. The DLVO theory describes the force between charged surfaces interacting through a liquid. However, this theory may not be appropriate for modeling bacterial adhesion owing to the numerous processes involved and the influence of both biological and environmental factors (pH, ionic strength, and temperature) [105,106]. The non-specific phase of adhesion is a consequence of the balance between attractive and repulsive forces that are set up between the bacterium and the surface where it could adhere [107,108]. These forces include non-covalent interactions such as electrostatic interactions or surface charges, van der Waals forces, and Lewis acid/base interactions, as well as hydrophobic interactions [109,110]. Hydrophobic interactions and surface charges are the primary forces influencing bacterial adhesion [111].

4.2.1. Cell Surface Hydrophobicity

Bacterial cell surface hydrophobicity (CSH) is probably one of the major phenomena that governs bacterial attachment to a surface [109,110]. Hydrophobic interactions are defined as the ability of two elements of similar hydrophobicity to attract each other [112]. These forces are affected by the nature of their membrane-anchored components, including amino residues that are exposed to the extracellular environment [113]. In the context of STEC and MFGs, both are surrounded by a protein-rich membrane whose anchored surface components have polar properties (e.g., proteins and phospholipids) leading to weak hydrophobic repulsions [114,115]. Interestingly, Brisson et al. showed that the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to MFGs was strain-dependent, and the more the strain was hydrophobic, the more it adhered [94].

4.2.2. Electrostatic Forces

Electrostatic forces result from the presence of a double ionic layer at the surface of a particle. The bacterial cell surface is generally negatively charged because of the carboxyl and phosphate core as well as the lipopolysaccharide (LPS) located at the surface [116]. *E. coli* surface charge is between -30 and -45 mV at milk pH [117,118]. While there are no published STEC-specific surface charge data generated with a modern instrument, some studies have shown that STEC isolates or reference strains are weakly negative [119,120]. Native MFGs are negatively charged due to the high phospholipid content of the outer layer of the MFGM [121]. The ζ -potential of native MFGs is close to -13 mV [122–124]. Furthermore, Malik et al. showed that the MFGM fraction could reach -20 mV at pH 6.5 [125]. When a negative surface meets another negative surface, repulsive forces are produced. Thus, in theory, MFGs and STEC should repel each other. However, it is important to note that the bacterial surface charge should be measured in an appropriate buffer that mimics the properties of raw milk, such as milk ultrafiltration permeate. There is a lack of recent experimental data with appropriate physicochemical conditions to assess the involvement of these forces in the association of STEC with MFGs.

4.2.3. Van der Waals Forces

Van der Waals interactions are long-range attractive forces present in both polar and non-polar molecules and come mainly from the fluctuation of the internal charge of a particle. These forces are generally attractive and result from induced dipole interactions between molecules in a colloidal particle and a substrate [126]. Attractive van der Waals forces are ubiquitous between molecules [127] and could explain part of the interaction between bacteria and the MFGM. However, van der Waals interactions in MFGM–bacteria adhesion have not been studied.

4.2.4. Lewis Acid/Base Interactions

The Lewis acid/base interaction is a polar interaction where acceptor/donor electrons enable the formation of hydrogen bonds also known as Lewis bonds [128]. This link occurs whenever ligands of strong electronegativity are associated with hydrogen. These short-range bonds are strong electrostatic interactions. Kiely and Olson showed that *L. casei* strains and MFGs behaved as electron donors and could mediate bonds [129,130]. However, the role of Lewis bonds in MFGM–bacteria adhesion was not fully investigated.

4.3. Specific Molecular Interactions

Bacterial molecules involved in adhesion, called adhesins, recognize specific oligosaccharide moieties or peptide residues on the surface of target cells. There are many different adhesins, including porins, complex protein structures, glycoproteins, and glycolipids. Three main types of adhesin–receptor interactions have been described: lectin–glycan; protein–protein; and hydrophobin–protein [131]. Lectins are key factors in bacterial adhesion mechanisms [132–134]. Lectins are adhesins that recognize glycoconjugates, the sugar epitopes generally associated with proteins or lipids. Glycoconjugates are polymeric carbohydrates composed of monosaccharides arranged in chains and preferentially present on the external leaflet either attached to lipids or proteins [135]. Commonly, the polysaccharides of glycoconjugates are referred to as the ‘glycan layer’ or ‘glycocalyx’ [136]. The glycocalyx is directly exposed to the environment, allowing interactions with other cells to facilitate cell communication, immune regulation, and adhesion [137].

A wide range of STEC isolates can be responsible for human infections, and these can be genetically different [138]. However, regardless of the strain or serogroup, STEC possess virulence factors (Figure 1) that allow attachment to intestinal epithelial cells (IECs), and these adhesion factors are generally considered essential for infection. A large range of polysaccharides exists, but only a subset is exposed at the cell surface where they can be recognized by complementary receptors. Adhesins can be found at the distal end of bacterial pili (or fimbriae). These are bacterial extracellular appendages approximately 1 to 20 µm long and <2 to 10 nm in diameter [139]. Other adhesins are anchored directly in the biological membrane of bacteria and are referred to as afimbrial adhesins [59,63].

4.3.1. MFGM as a Decoy Receptor for STEC

Douëllou et al. showed that raw milk reduced the adhesion of two STEC strains (O157:H7 str. EDL933 and O26:H11 str. 21765) to intestinal cells in vitro and in vivo, whereas pasteurized milk did not [88]. Furthermore, Brewster and Paul showed that more than 98% of the pathogenic bacteria (including STEC) added to pasteurized or homogenized milk were recovered in the pellet after centrifugation, while less than 7% were recovered from raw milk, suggesting that processing could weaken the MFG–bacteria association [89]. Another study demonstrated that only MFGM proteins and glycoproteins inhibited *E. coli* adhesion in the Caco-2/HT-28 model [140]. In addition, Ross et al. suggested that the anti-infective activity of MFGM is due to the interaction of bacteria with MFGM proteins and glycoproteins rather than the interaction between MFGM and host cell receptors. In addition, modifications to MFGM surfaces such as surface roughness, zeta potential, MFG size, and phospholipid content can drastically impair the adhesive properties of *L. fermentum* [124]. The MFGM can also inhibit ETEC hemagglutination, suggesting that similar motifs are present on both membranes [141].

4.3.2. MFGM Proteins and Glycoproteins Potentially Targeted by STEC

No published studies have focused on which MFGM proteins are recognized by STEC or which adhesins are involved. However, studies have been conducted on other bacterial models (mostly beneficial). Guerin et al. used atomic force microscopy (AFM) to show that the spaCBA pili of *L. rhamnosus* engaged with the MFGM. Another experiment conducted by Novakovic et al. demonstrated, by blot overlay, binding of the ETEC F4ac pili to various porcine MFGM or milk proteins, including lactadherin, butyrophilin,

adipophilin, acyl-CoA synthetase 3, and fatty acid-binding protein 3 [142]. An extensive literature search highlighted several MFGM proteins or glycoproteins that could interact with bacteria (Table 1). As an example, Zg16 can bind peptidoglycan [143]. Milk whey proteins such as lactoferrin, β -lactoglobulin, and α -lactalbumin can be adsorbed on the MFGM by heat treatment [144,145] and can be bound by bacteria. Glycoproteins such as mucins (MUC1 and MUC15), CD59, ECM proteins (tenascin, vitronectin), butyrophilin, prolactin-inducible protein (mPIP), CD36, and alpha1-antichymotrypsin can be bacterial lectin targets (Table 1). Among this non-exhaustive list, mucins could well be potential targets for STEC. Mucins are highly glycosylated proteins known to adhere to bacteria. Mucins constitute mucus, a secreted gel that binds the intestinal microbiota and protects the epithelium from pathogens [146,147]. Additionally, EF-Tu, a ubiquitous bacterial protein that can bind many proteins and mediate adhesion, could potentially interact with the MFGM [148].

Table 1. MFGM proteins or glycoproteins that are potentially bound by STEC.

Bovine MFGM Components	Bacterial Components	References
Adipophilin * (ADPH)	F4ac (<i>E. coli</i>) fimbria	[142]
Alpha 1-antichymotrypsin (serpin)	-	[149]
Annexins A1, A2, A5	LPS (lipid A), OmpB, YadC (tip adhesion of Yad fimbriae)	[150–152]
Apolipoprotein serum amyloid A protein	OmpA	[153]
Apolipoproteins	LPS	[154,155]
Butyrophilin *	F4ac (<i>E. coli</i>) fimbria	[29,142]
Calnexin	LPS, peptidoglycan	[156]
Cathelicidin 1	LPS, LTA	[157]
CD36 *	LPS, LTA	[29,158]
CD5L protein	-	[159]
Elongation factor thermal unstable Tu (EF-Tu)	-	[148]
Fatty acid-binding protein *	F4ac (<i>E. coli</i>) fimbria	[142]
Fibrinogen	Fibrinogen-binding protein (MSCRAMMs), curli	[160–165]
Galectin 7	LPS	[166]
Gelsolin	LPS, LTA	[167]
Immunoglobulins	Many bacterial proteins	-
Integrin	Many bacterial proteins	[52,165,168–171]
Lactadherin *	F4ac (<i>E. coli</i>) fimbria	[142,172]
Lactoferrin	OMPs	[173]
Macrophage scavenger receptor	LPS, LTA	[174]
MUC1 *, MUC15 *	Many bacterial proteins	[175]
Polymeric immunoglobulin receptor (PIgR)	Ig-mediated adhesion, direction interaction via adhesion	[176,177]
Prolactin-inducible protein (mPIP)	-	[178,179]
Peptidoglycan recognition protein 1	-	[180]
Protein disulfide-isomerase (PDI)	-	[181]
Toll-like receptor 4, 2	Many bacterial proteins	[182–185]
Uromodulin	Surface layer protein A, FimH	[186,187]
Vimentin	Many bacterial proteins	[188]
Vitronectin	Many bacterial proteins	[189]
Zymogen granule protein 16 homolog B	LTA, peptidoglycan	[190]
β -lactoglobulin	Spa pili	[191,192]

MFGM proteins were obtained from [33,193,194]. * Major MFGM proteins.

Besides proteins, a strain-specific adhesion between milk phospholipids (MPLs) and lactic acid bacteria (LAB) has been shown [195,196]. D’Incecco et al. showed that in the case of the presence of *Clostridium tyrobutyricum* spores in raw milk, these spores can be localized at the proximity of MFGs [90]. Like bacteria, the spore’s surface is decorated by polysaccharides and anchored extracellular appendages that mediate lectin–carbohydrate interactions [197,198]. However, the surface structure of *Clostridium tyrobutyricum* spores involved in the association with MFG was not identified in the study. Interestingly, further

experiments conducted by D'Incecco et al. used transmission electron microscopy (TEM) to show that *C. tyrobutyricum* interacted with the MFGM through an amorphous substance containing IgA [199].

Milk provides not only nutrients but also protection to newborns through immunocompetent cells, antimicrobial peptides, oligosaccharides, immunoglobulins (Igs), cytokines, growth factors, and lysosomes [200]. Bovine MFGs contain numerous immune-related proteins including proteins with bacterial binding capacities. Immune proteins are well characterized and known to recognize specific epitopes on pathogens. Immunoglobulins and immune cells in milk reflect the mother's pathogen exposure and can provide immunity against some pathogens. Studies have shown that IgA, secreted-IgA (sIgA), and IgM are concentrated in the cream layer and can adsorb onto human [201,202] or bovine [90] MFGM surfaces. These adsorbed Igs may act as mediators of bacterial adherence to MFGs. Other studies have demonstrated the efficacy of bovine Igs against various human pathogens related to diarrhea [203–205]. Antibodies against pathogenic *E. coli* are common in samples of human milk [206,207]. Several studies have also shown that bovine colostrum contains antibodies to *E. coli* O157:H7 and other pathogens, regardless of whether the animals were immunized (vaccinated) or not. These antibodies can confer protection against relevant pathogens to humans [208–210]. Oliveira et al. showed that Igs could interact with ETEC fimbrial proteins and block adhesion to host receptors [211]. It has also been reported that K88-positive *E. coli* adhere to MFGs through IgA [212].

The spontaneous agglutination of MFGs in cold milk is due to the presence of immunoglobulins, called cryoglobulins [213]. Cryoglobulins are large molecules that precipitate at low temperatures (<37 °C) and disperse again on warming. Cryoglobulins are probably involved in bacterial clarification during natural creaming [214]. Immunoglobulin cell receptors are present on both the bacterial surface and MFGMs and, therefore, could act as a bridge. A generic IgG receptor is present in cold-stored MFGM preparations, but bacterial interaction has not been shown [215]. The polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) is present on intestinal epithelial cells and facilitates the transcytosis of Igs, especially IgA, and immune complexes [177,216].

Toll-like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4), which recognize foreign antigens, are present at low levels on MFGMs [33]. For example, FimH, the adhesive tip from the Type 1 fimbriae of *E. coli*, binds to mannose, TLR4, and CD48 [183,217]. Furthermore, TLR2 recognizes lipoteichoic acid (LTA), peptidoglycan, lipoprotein, curli, and other pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [184,185,218]. CD36 is a scavenger receptor that binds lipopolysaccharide (LPS) and other ligands [219]. Cathelicidins are antimicrobial peptides that can bind LPS [157]. Peptidoglycan recognition protein 1 (PRP1) is an antibacterial protein that can kill Gram-positive bacteria by binding to peptidoglycans and interfering with peptidoglycan biosynthesis [180].

5. Consequences of the STEC–MFG Association

5.1. Difficulties in Detecting STEC in Raw Milk Products

STEC detection in food matrices classically relies on four different steps: sample preparation; enrichment; detection; and confirmation by bacterial isolation. The enrichment step consists of adding an enrichment broth to the matrix to enable growth of the target bacteria. In the detection step, a genetic method is implemented to detect the presence of target bacteria by PCR screening. Finally, the confirmation step is carried out. This confirmation is based on isolation of target bacteria grown on selective media. Immunoconcentration tools using magnetic beads spiked with antibodies can also be used in this step. The ISO TS13136:2012 is the standard currently used to detect and isolate STEC belonging to O157, O26, O103, O111, and O145 serogroups and carrying *eae* and *stx* genes in food samples.

STEC detection in raw milk cheeses is particularly challenging. First, bacterial DNA is extracted from a specific volume of enrichment broth. Then, STEC target genes (*eae*, *stx*, and genes encoding one of the five somatic antigens) are detected. However, the microflora of cheese contains bacteria that carry some of the genes used to screen for STEC. For example,

some non-STEC strains of *E. coli* (such as enteropathogenic *E. coli* (EPEC)) carry the *eae* gene or contain phages carrying the *stx* gene. Some other bacterial strains can also carry the *stx* gene, including *Citrobacter freundii*, *Shigella* spp., *Acinetobacter*, *Aeromonas* spp., *Hafnia alvei*, *Escherichia albertii*, *Escherichia cloacae*, and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) [44]. The presence of these bacteria in raw milk cheese can lead to positive PCR results even though STEC isolates are not present in the enrichment broth (false positives). Furthermore, the performance of the methods (LOD) varies depending on the methods used and the matrices analyzed.

In general, STEC detection is more difficult in cheese than in meat. The LODs of the different detection methods are approximately 5–10 cells/g and 10–50 cells/g for bovine meat and raw milk cheese, respectively [220,221]. The presence of a richer flora and a higher amount of fat in cheese compared with meat may be an explanation. As discussed above, bacteria are preferentially found in contact with MFGs in raw milk products; however, the available detection kits perform DNA extraction on the pelleted fraction. Moreover, MFGs can interfere with DNA extraction methods by blocking spin column filters and acting as a PCR inhibitor [222,223]. Lower efficiency of bacterial DNA extraction can lead to false negative PCR results from enrichment broth samples. Several authors have described this phenomenon for various milk origins and suggest performing the extraction on both the cream and pelleted fraction. Sun et al. showed that cream harbors bacterial species that may be underestimated when skimmed milk, rather than whole milk, is used for DNA extraction [96]. Stinson et al. showed that a significant amount of human and bacterial cells remains with the cream and that bacterial DNA profiles can vary between fractions, especially for staphylococcal species [223]. The authors suggested that high-speed centrifugation may be insufficient to pellet bacterial or eukaryotic cells from milk. Furthermore, MFGs and proteins such as caseins can disrupt the interaction between immunomagnetic beads and STEC during the confirmation step. Tween 20 can be added at this stage to improve sample homogenization and block non-specific interactions [224].

Finally, STEC isolation to confirm the presence of the bacteria is also very difficult in raw milk cheese because the cheese microbiota limits STEC growth on agar plates. In addition, the different challenges encountered during cheese processing as well as the stresses suffered by STEC during the detection protocol can lead to viable but nonculturable (VBNC) isolates [225].

These studies emphasize the importance of using whole milk instead of skimmed milk for DNA extraction, but MFGs can perturb downstream applications. To improve the recovery rate of STEC in raw milk products, it seems essential to identify the nature of the STEC–MFG association in order to dissociate the two before performing the detection process. The identification of milk components involved in PCR inhibition and the improvement of DNA purification methods would allow the development of new kits to extract bacterial DNA from milk and cream. It should be noted that, despite these limitations, available DNA kits are still very effective. Quigley et al. showed that commercial kits provided very pure DNA suitable for PCR amplification from raw milk and raw milk cheese [226]. Furthermore, ISO 6887 recommends the addition of Tween 80 when enriching high-fat matrix to improve detection and bacterial isolation. However, no formal study has shown a significant effect due to the addition of Tween 80. Finally, at the enrichment temperature (37 °C or 41.5 °C), the lipids form a surface layer that may contain the desired bacterial cells and contribute to the reduction of available oxygen and thus modify the physiological state of the bacteria.

Figure 2 brings together the different concepts discussed in this section.

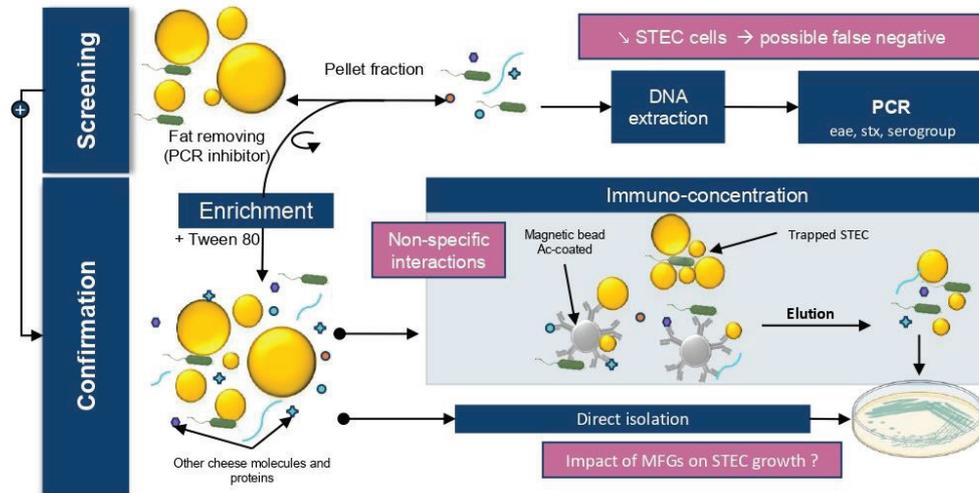


Figure 2. Impact of MFGs on STEC detection in dairy matrix. STEC detection in food matrices classically relies on 4 different steps: sample preparation; enrichment; detection; and confirmation by bacterial isolation.

5.2. Impact of Creaming on the Presence of STEC in Milk

One of the industry's goals should be a non-invasive method to eliminate pathogenic bacteria in raw milk without affecting the nutritional qualities and raw milk microbiota of the final product. Many techniques exist, such as bactofugation and microfiltration, [227], but these techniques affect MFG structure [82] and also remove the raw milk microflora. In our lab, we performed a raw milk skimming assay by electric centrifuge, and *E. coli* were not found in significant numbers in the cream fraction [228]. Stronger centrifugal forces are applied by the centrifuge; therefore, the STEC–MFG association is probably too weak to overcome the centrifugal forces. However, it was reported that natural creaming produces reduced-fat milk with a lower bacterial count and fewer somatic cells [229]. MFGs spontaneously rise to the surface due to the difference in density between MFGs and the aqueous phase (Stokes' law) [230]. As previously discussed, STEC were predominantly found in the cream layer after raw milk creaming [88]. Therefore, performing natural creaming methods before cheese transformation could decrease the level of STEC in the final product. However, no study has been conducted in experimental field conditions (with low STEC contamination levels).

5.3. Anti-Adhesive Strategies

As bacterial adhesion is the first step of infection, inhibiting this step is a key strategy for infection control. Competition for the natural binding sites of pathogenic bacteria by mimetic receptors could inhibit pathogen attachment. Several natural food components could act as efficient inhibitors of pathogen adherence [30,100,231–233], especially milk components [29,234]. Moreover, numerous experimental studies have shown that the association of bacteria with MFGs could prevent the adhesion of several enteropathogens to enterocytes through mimetic receptors [142,172,235–240]. To avoid STEC adhesion to the epithelium of the intestinal mucosa, the STEC–MFG complex must be maintained at the site of STEC adhesion. Therefore, the expression of STEC genes involved in adhesion must be able to occur in product and during the human digestive process.

MFGM glycoconjugates are the main macromolecules involved in the anti-adhesive properties of milk against enteropathogens [29,73]. The MFGM protein fraction shows similarities to intestinal cells. Major MFGM proteins are conserved between species, although there are variations in protein expression levels and molecular functions between species and stages of lactation [241]. The MFGM was recently recognized as a high value-added ingredient, and the valorization of this by-product is constantly increasing. The MFGM, or some of its components, are added to infant milk formulas because of the MFGM's beneficial properties [241–245]. More studies should be conducted to identify the MFGM surface glyco-epitopes recognized by STEC. These data could lead to pharmaceutical development of a specific drug to treat STEC infections. Currently available therapeutic solutions for STEC are controversial.

6. Conclusion and Future Directions

MFGs can associate with beneficial and pathogenic bacteria, including STEC. To date, we do not have sufficient evidence to confirm the adhesion of STEC to bovine MFGs and more specifically to the MFGM. However, the research discussed in this review highlights a real association between STEC and MFGs that impacts bacterial pathogenicity (Figure 3). Based on studies with other bacterial models, STEC adhesion factors may adhere to MFGM glycoconjugates, resulting in impaired bacterial adhesion to host cells. The association mechanisms remain unclear, but several phenomena are likely to be involved. The large diversity of STEC isolates and the complexity of bacterial adhesion make it difficult to study these mechanisms. Few studies have assessed STEC adhesion to the glycoconjugates contained in raw milk products. We need to better understand the mechanisms of this adhesion, including the molecular factors involved and the binding strength. Therefore, it is important to identify and better characterize STEC adhesion factors and their implication in the infection cycle. In addition, more complete studies should be conducted to elucidate the location of this pathogen in raw milk cheese products and how the STEC–MFG association changes once the product is ingested by humans. To ensure inhibition of STEC adhesion to enterocytes, the STEC–MFG complex must be resistant to human digestive processes.

Research on the anti-adhesive properties of bovine MFGM components is recent and needs to be further pursued as a new source of antibacterial molecules. In the long-term, specific (glyco)-proteins derived from the MFGM could be developed as preventive or therapeutic tools against STEC or other enterobacteria. Nevertheless, bacteria–MFG adhesion is not specific to STEC and can lead to contrasting effects depending on the bacterial species involved. For STEC or other pathogenic bacteria, the association has an overall health benefit by reducing bacterial adhesion to host cells. In contrast, reducing the adhesion of beneficial bacteria or probiotics may not be as beneficial. Parallel studies using various bacterial models would improve our understanding of this phenomenon and may help to identify a molecule that inhibits unwanted adhesions, while preserving beneficial microflora adhesion. In addition, anti-adhesive molecule(s) could be used to improve STEC detection in dairy matrices. MFGs can affect the detection process and decrease the chances of isolating bacteria from a suspect product. Finally, the influence of the interaction of dairy matrix and specific components such as MFGM on the regulation of STEC virulence genes should be studied.

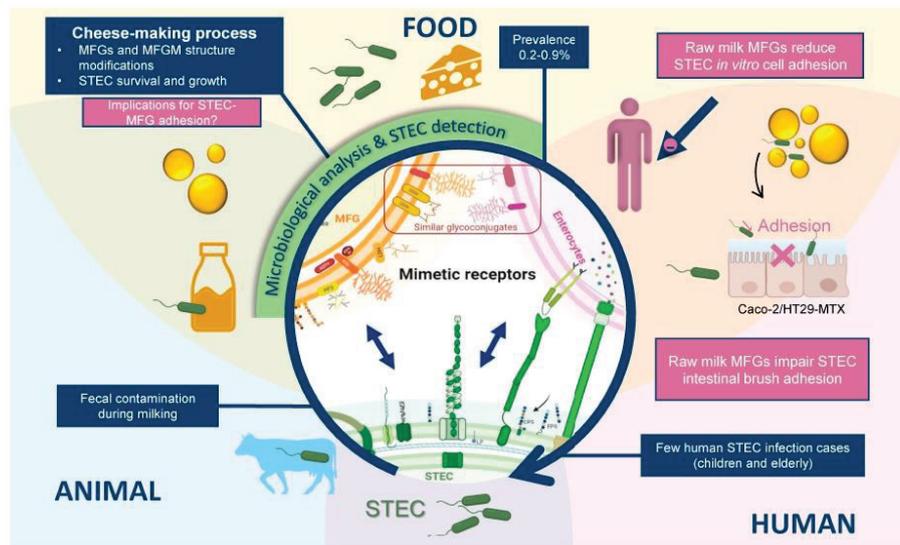


Figure 3. MFGM as an anti-adhesive modulator of STEC. Ruminants (cattle, buffalo, goats, and sheep) are the main reservoir of STEC. Infected ruminants harbor the bacteria in their gastrointestinal tract without any symptoms of illness and shed them in their feces. Raw milk can reduce the adhesion of STEC strains to host intestinal cells. The association of STEC with MFGs can be seen as a host–bacteria adhesion facilitated by the epithelial origin of the MFGM and its similarities with the membrane of intestinal cells. Both biological membranes interact through surface components. Various glycoconjugates are anchored on the MFGM surface and can act as ligands. The molecules involved in the association have not been identified.

Author Contributions: Conceptualization, A.B. and D.S.; writing—original draft preparation, A.B. and D.S.; visualization, A.B.; funding acquisition, D.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Centre National Interprofessionnel de l’Economie Laitière (CNIEL, French Dairy Interbranch Organization, Paris) and VetAgro Sup.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Figures created with BioRender.com and Microsoft Office. The authors thank Leah Cannon, for English language editing of this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. CNIEL Laites Liquides. Available online: <https://www.filiere-laitiere.fr/fr/laites-liquides> (accessed on 5 January 2022).
2. International Dairy Federation. *IDF Annual Report*; International Dairy Federation: Schaerbeek, Belgium, 2021.
3. Jost, R. Milk and Dairy Products. *Ullmann’s Encycl. Ind. Chem.* **2007**, *23*, 315–375.
4. CNIEL Fromages. Available online: <https://www.filiere-laitiere.fr/fr/fromages> (accessed on 12 January 2022).
5. Quigley, L.; O’Sullivan, O.; Stanton, C.; Beresford, T.P.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Cotter, P.D. The Complex Microbiota of Raw Milk. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37*, 664–698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Skeie, S.B.; Håland, M.; Thorsen, I.M.; Narvhus, J.; Porcellato, D. Bulk Tank Raw Milk Microbiota Differs within and between Farms: A Moving Goalpost Challenging Quality Control. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 1959–1971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Machado, S.G.; Baglinière, F.; Marchand, S.; Van Coillie, E.; Vanetti, M.C.D.; De Block, J.; Heyndrickx, M. The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Lucey, J.A. Raw Milk Consumption: Risks and Benefits. *Nutr. Today* **2015**, *50*, 189–193. [[CrossRef](#)]
9. Crippa, G.; Zabzuni, D.; Bravi, E.; Piva, G.; De Noni, I.; Bigli, E.; Rossi, F. Randomized, Double Blind Placebo-Controlled Pilot Study of the Antihypertensive Effects of Grana Padano D.O.P. Cheese Consumption in Mild–Moderate Hypertensive Subjects. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2018**, *22*, 7573–7581. [[CrossRef](#)]
10. Loss, G.; Apprigh, S.; Waser, M.; Kneifel, W.; Genuneit, J.; Büchele, G.; Weber, J.; Sozanska, B.; Danielewicz, H.; Horak, E.; et al. The Protective Effect of Farm Milk Consumption on Childhood Asthma and Atopy: The GABRIELA Study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *128*, 766–773.e4. [[CrossRef](#)]
11. PASTURE Project Protection against Allergy: Study in Rural Environments. Available online: <https://cordis.europa.eu/project/id/QLK4-CT-2001-00250/fr> (accessed on 5 January 2022).
12. French Ministry of Agriculture and Food Consumption of Cheeses Made from Raw Milk: Reminder of the Precautions to Take. Available online: <https://agriculture.gouv.fr/consommation-de-fromages-base-de-lait-cru-rappel-des-precautions-prendre> (accessed on 18 October 2021).
13. Baylis, C.L. Raw Milk and Raw Milk Cheeses as Vehicles for Infection by Verotoxin-Producing *Escherichia Coli*. *Int. J. Dairy Technol.* **2009**, *62*, 293–307. [[CrossRef](#)]
14. Currie, A. Outbreak of *Escherichia Coli* O157:H7 Infections Linked to Aged Raw Milk Gouda Cheese. *J. Food Prot.* **2018**, *81*, 325–331. [[CrossRef](#)]
15. Espié, E.; Mariani-Kurkdjian, P.; Grimont, F.; Pihier, N.; Vaillant, V.; Francart, S.; Capek, I.; De Valk, H.; Vernozzy-Rozand, C. Shiga-Toxin Producing *Escherichia Coli* O26 Infection and Unpasteurised Cows Cheese, France, 2005. In Proceedings of the 6th International Symposium on STEC, Melbourne, Australia, 30 October 2006.
16. FAO/WHO. *Attributing Illness Caused by Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli (STEC) to Specific Foods*; FAO: Rome, Italy, 2019.
17. Honish, L.; Predy, G.; Hislop, N.; Chui, L.; Kowalewska-Grochowska, K.; Trottier, L.; Kreplin, C.; Zazulak, I. An Outbreak of *E. Coli* O157:H7 Hemorrhagic Colitis Associated with Unpasteurized Gouda Cheese. *Can. J. Public Health* **2005**, *96*, 182–184. [[CrossRef](#)]
18. Mungai, E.A.; Behraves, C.; Gould, L. Increased Outbreaks Associated with Nonpasteurized Milk, United States, 2007–2012. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 119–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Perrin, F.; Tenenhaus-Aziza, F.; Michel, V.; Miszczycha, S.; Bel, N.; Sanaa, M. Quantitative Risk Assessment of Haemolytic and Uremic Syndrome Linked to O157:H7 and Non-O157:H7 Shiga-Toxin Producing *Escherichia Coli* Strains in Raw Milk Soft Cheeses. *Risk Anal.* **2015**, *35*, 109–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Treacy, J. Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* O157:H7 Linked to Raw Drinking Milk Resolved by Rapid Application of Advanced Pathogen Characterization Methods. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1800191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Etcheverría, A.L.; Padola, N.L. Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli*. *Virulence* **2013**, *4*, 366–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. AFFSA. *Bilan des Connaissances Relatives Aux Escherichia Coli Producteurs de Shiga-Toxines (STEC)*; French Food Safety Agency: Maisons-Alfort, France, 2003; p. 220.
23. EU Directorate-General for Health and Food Safety RASFF. Available online: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search> (accessed on 2 February 2022).
24. EFSA. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2019**, *17*, e05926. [[CrossRef](#)]
25. EFSA. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2021**, *19*, e06406. [[CrossRef](#)]
26. EFSA. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2021**, *19*, e06971. [[CrossRef](#)]
27. Douëllou, T.; Delannoy, S.; Ganet, S.; Mariani-Kurkdjian, P.; Fach, P.; Loukiadis, E.; Montel, M.; Thevenot-Sergentet, D. Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Strains Isolated from Dairy Products—Genetic Diversity and Virulence Gene Profiles. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *232*, 52–62. [[CrossRef](#)]
28. Claeys, W.L.; Cardoen, S.; Daube, G.; De Block, J.; Dewettinck, K.; Dierick, K.; De Zutter, L.; Huyghebaert, A.; Imberechts, H.; Thiange, P.; et al. Raw or Heated Cow Milk Consumption: Review of Risks and Benefits. *Food Control* **2013**, *31*, 251–262. [[CrossRef](#)]
29. Douëllou, T.; Montel, M.C.; Thevenot-Sergentet, D. Invited Review: Anti-Adhesive Properties of Bovine Oligosaccharides and Bovine Milk Fat Globule Membrane-Associated Glycoconjugates against Bacterial Food Enteropathogens. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 3348–3359. [[CrossRef](#)]
30. Ofek, I.; Hasty, D.L.; Sharon, N. Anti-Adhesion Therapy of Bacterial Diseases: Prospects and Problems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2003**, *38*, 181–191. [[CrossRef](#)]
31. Yoon, Y.; Lee, S.; Choi, K.-H. Microbial Benefits and Risks of Raw Milk Cheese. *Food Control* **2016**, *63*, 201–215. [[CrossRef](#)]
32. Kosmerl, E.; Rocha-Mendoza, D.; Ortega-Anaya, J.; Jiménez-Flores, R.; García-Cano, I. Improving Human Health with Milk Fat Globule Membrane, Lactic Acid Bacteria, and Bifidobacteria. *Microorganisms* **2021**, *22*, 341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Reinhardt, T.A.; Lippolis, J.D. Bovine Milk Fat Globule Membrane Proteome. *J. Dairy Res.* **2006**, *73*, 406–416. [[CrossRef](#)]
34. Spitsberg, V.L. Invited Review: Bovine Milk Fat Globule Membrane as a Potential Nutraceutical. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 2289–2294. [[CrossRef](#)]
35. CNIEL. *L'économie Laitière en Chiffre-Edition 2021*; CNIEL: Paris, France, 2021; p. 204.
36. Insee Principales Caractéristiques Des Entreprises En 2017—Caractéristiques Comptables, Financières et d'emploi Des Entreprises En 2017 | Insee. Available online: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/4226019?sommaire=4226092#consulter-sommaire> (accessed on 10 January 2022).

37. CNIEL Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière. Available online: <https://www.filiere-laitiere.fr/fr/> (accessed on 12 January 2022).
38. Karmali, M.A.; Gannon, V.; Sargeant, J.M. Verocytotoxin-Producing *Escherichia Coli* (VTEC). *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 360–370. [CrossRef]
39. Salaaheen, S.; Kim, S.W.; Cao, H.; Wolfgang, D.R.; Hovingh, E.; Karns, J.S.; Haley, B.J.; Van Kessel, J.A.S. Antimicrobial Resistance Among *Escherichia Coli* Isolated from Veal Calf Operations in Pennsylvania. *Foodborne Pathog. Dis.* **2019**, *16*, 74–80. [CrossRef]
40. Brown, C.A.; Harmon, B.G.; Zhao, T.; Doyle, M.P. Experimental *Escherichia Coli* O157:H7 Carriage in Calves. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 27–32. [CrossRef]
41. Chapman, P.A.; Cerdán Malo, A.T.; Ellin, M.; Ashton, R.; Harkin, M.A. *Escherichia Coli* O157 in Cattle and Sheep at Slaughter, on Beef and Lamb Carcasses and in Raw Beef and Lamb Products in South Yorkshire, UK. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *64*, 139–150. [CrossRef]
42. Sarimehmetoglu, B.; Aksoy, M.H.; Ayaz, N.D.; Ayaz, Y.; Kuplulu, O.; Kaplan, Y.Z. Detection of *Escherichia Coli* O157:H7 in Ground Beef Using Immunomagnetic Separation and Multiplex PCR. *Food Control* **2009**, *20*, 357–361. [CrossRef]
43. Ruegg, P.L. Practical Food Safety Interventions for Dairy Production. *J. Dairy Sci.* **2003**, *68*, E1–E9. [CrossRef]
44. WHO; FAO. *Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli (STEC) and Food: Attribution, Characterization, and Monitoring: Report*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018.
45. Bai, X.; Fu, S.; Zhang, J.; Fan, R.; Xu, Y.; Sun, H.; He, X.; Xu, J.; Xiong, Y. Identification and Pathogenomic Analysis of an *Escherichia Coli* Strain Producing a Novel Shiga Toxin 2 Subtype. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6756. [CrossRef]
46. Hughes, A.C.; Zhang, Y.; Bai, X.; Xiong, Y.; Wang, Y.; Yang, X.; Xu, Q.; He, X. Structural and Functional Characterization of Stx2k, a New Subtype of Shiga Toxin 2. *Microorganisms* **2019**, *8*, 4. [CrossRef] [PubMed]
47. He, X.; Patfield, S.; Rasooly, R.; Mavric, D. Novel Monoclonal Antibodies against Stx1d and 1e and Their Use for Improving Immunoassays. *J. Immunol. Methods* **2017**, *447*, 52–56. [CrossRef] [PubMed]
48. Koutsoumanis, K.; Allende, A.; Alvarez-Ordóñez, A.; Bover-Cid, S.; Chemaly, M.; Davies, R.; Cesare, A.D.; Herman, L.; Hilbert, F.; Lindqvist, R.; et al. Pathogenicity Assessment of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* (STEC) and the Public Health Risk Posed by Contamination of Food with STEC. *EFSA J.* **2020**, *18*, e05967. [CrossRef]
49. FAO/WHO STEC EXPERT GROUP Hazard Identification and Characterization: Criteria for Categorizing Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* on a Risk Basis. *J. Food Prot.* **2019**, *82*, 7–21. [CrossRef] [PubMed]
50. Newton, H.J.; Sloan, J.; Bulach, D.M.; Seemann, T.; Allison, C.C.; Tauschek, M.; Robins-Browne, R.M.; Paton, J.C.; Whittam, T.S.; Paton, A.W.; et al. Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Strains Negative for Locus of Enterocyte Effacement. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 372–380. [CrossRef]
51. Colello, R.; Krüger, A.; Velez, M.V.; Del Canto, F.; Etcheverría, A.I.; Vidal, R.; Padola, N.L. Identification and Detection of Iha Subtypes in LEE-Negative Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* (STEC) Strains Isolated from Humans, Cattle and Food. *Heliyon* **2019**, *5*, e03015. [CrossRef] [PubMed]
52. Frankel, G.; Lider, O.; Hershkoviz, R.; Mould, A.P.; Kachalsky, S.G.; Candy, D.C.A.; Cahalon, L.; Humphries, M.J.; Dougan, G. The Cell-Binding Domain of Intimin from Enteropathogenic *Escherichia Coli* Binds to B1 Integrins. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20359–20364. [CrossRef] [PubMed]
53. Sinclair, J.F.; O'Brien, A.D. Cell Surface-Localized Nucleolin Is a Eukaryotic Receptor for the Adhesin Intimin- γ of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 2876–2885. [CrossRef]
54. Sinclair, J.F.; O'Brien, A.D. Intimin Types α , β , and γ Bind to Nucleolin with Equivalent Affinity but Lower Avidity than to the Translocated Intimin Receptor. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33751–33758. [CrossRef] [PubMed]
55. Farfan, M.J.; Torres, A.G. Molecular Mechanisms That Mediate Colonization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Strains. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 903–913. [CrossRef] [PubMed]
56. Farfan, M.J.; Cantero, L.; Vidal, R.; Botkin, D.J.; Torres, A.G. Long Polar Fimbriae of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7 Bind to Extracellular Matrix Proteins. *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 3744–3750. [CrossRef]
57. Herold, S.; Paton, J.C.; Paton, A.W. Sab, a Novel Autotransporter of Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia Coli* O113:H21, Contributes to Adherence and Biofilm Formation. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 3234–3243. [CrossRef] [PubMed]
58. Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L. Pathogenic *Escherichia Coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 123–140. [CrossRef] [PubMed]
59. McWilliams, B.D.; Torres, A.G. EHEC Adhesins. *Microbiol. Spectr.* **2014**, *2*, EHEC-0003-2013. [CrossRef]
60. Erdem, A.L.; Avelino, F.; Xicohtencatl-Cortes, J.; Girón, J.A. Host Protein Binding and Adhesive Properties of H6 and H7 Flagella of Attaching and Effacing *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7426–7435. [CrossRef]
61. Lu, Y.; Iyoda, S.; Satou, H.; Satou, H.; Itoh, K.; Saitoh, T.; Watanabe, H. A New Immunoglobulin-Binding Protein, EibG, Is Responsible for the Chain-Like Adhesion Phenotype of Locus of Enterocyte Effacement-Negative, Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli*. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 5747–5755. [CrossRef]
62. Rubin, D.; Zhang, W.; Karch, H.; Kuczius, T. Distinct Expression of Immunoglobulin-Binding Proteins in Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Implicates High Protein Stability and a Characteristic Phenotype. *Toxins* **2017**, *9*, 153. [CrossRef]
63. Jaglic, Z.; Desvaux, M.; Weiss, A.; Nesse, L.L.; Meyer, R.L.; Demnerova, K.; Schmidt, H.; Giaouris, E.; Sipailiene, A.; Teixeira, P.; et al. Surface Adhesins and Exopolymers of Selected Foodborne Pathogens. *Microbiology* **2014**, *160*, 2561–2582. [CrossRef]

64. Meynier, A.; Genot, C. Molecular and Structural Organization of Lipids in Foods: Their Fate during Digestion and Impact in Nutrition. *OCL* **2017**, *24*, D202. [[CrossRef](#)]
65. Lopez, C.; Briard-Bion, V.; Ménard, O.; Beaucher, E.; Rousseau, F.; Fauquant, J.; Leconte, N.; Robert, B. Fat Globules Selected from Whole Milk According to Their Size: Different Compositions and Structure of the Biomembrane, Revealing Sphingomyelin-Rich Domains. *Food Chem.* **2011**, *125*, 355–368. [[CrossRef](#)]
66. Raynal-Ljutovac, K.; Bouvier, J.; Gayet, C.; Simon, N.; Joffre, F.; Fine, F.; Vendevre, J.-L.; Lopez, C.; Chardigny, J.-M.; Michalski, M.-C.; et al. Organisation structurale et moléculaire des lipides dans les aliments: Impacts possibles sur leur digestion et leur assimilation par l'Homme. *OCL* **2011**, *18*, 324–351. [[CrossRef](#)]
67. Evers, J.M.; Haverkamp, R.G.; Holroyd, S.E.; Jameson, G.B.; Mackenzie, D.D.S.; McCarthy, O.J. Heterogeneity of Milk Fat Globule Membrane Structure and Composition as Observed Using Fluorescence Microscopy Techniques. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 1081–1089. [[CrossRef](#)]
68. Keenan, T.; Mather, I. Intracellular Origin of Milk Fat Globules and the Nature of the Milk Fat Globule Membrane. In *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2006; pp. 137–171.
69. Lopez, C. Intracellular Origin of Milk Fat Globules, Composition and Structure of the Milk Fat Globule Membrane Highlighting the Specific Role of Sphingomyelin. In *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., O'Mahony, J.A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2020; pp. 107–131. ISBN 978-3-030-48686-0.
70. El-Zeini, H.M. Microstructure, Rheological and Geometrical Properties of Fat Globules of Milk from Different Animal Species. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2006**, *56*, 147–154.
71. Mather, I.H. A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane^{1,2}. *J. Dairy Sci.* **2000**, *83*, 203–247. [[CrossRef](#)]
72. Abd El-Salam, M.H.; El-Shibiny, S. Milk Fat Globule Membrane: An Overview with Particular Emphasis on Its Nutritional and Health Benefits. *Int. J. Dairy Technol.* **2020**, *73*, 639–655. [[CrossRef](#)]
73. Jiménez-Flores, R.; Brisson, G. The Milk Fat Globule Membrane as an Ingredient: Why, How, When? *Dairy Sci. Technol.* **2008**, *88*, 5–18. [[CrossRef](#)]
74. Farrokh, C.; Jordan, K.; Auvray, F.; Glass, K.; Oppegaard, H.; Raynaud, S.; Thevenot, D.; Condron, R.; De Reu, K.; Govaris, A.; et al. Review of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia Coli* (STEC) and Their Significance in Dairy Production. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *162*, 190–212. [[CrossRef](#)]
75. Rivero, M.A.; Passucci, J.A.; Rodriguez, E.M.; Parma, A.E. Role and Clinical Course of Verotoxigenic *Escherichia Coli* Infections in Childhood Acute Diarrhoea in Argentina. *J. Med. Microbiol.* **2010**, *59*, 345–352. [[CrossRef](#)]
76. Miszczycha, S.D.; Perrin, F.; Ganet, S.; Jamet, E.; Tenenhaus-Aziza, F.; Montel, M.-C.; Thevenot-Sergentet, D. Behavior of Different Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Serotypes in Various Experimentally Contaminated Raw-Milk Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 150–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Miszczycha, S.D.; Bel, N.; Gay-Perret, P.; Michel, V.; Montel, M.C.; Sergentet-Thevenot, D. Short Communication: Behavior of Different Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Serotypes (O26:H11, O103:H2, O145:H28, O157:H7) during the Manufacture, Ripening, and Storage of a White Mold Cheese. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 5224–5229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Donnelly, C. *Review of Controls for Pathogen Risks in Scottish Artisan Cheeses Made from Unpasteurised Milk*; Food Standards Scotland: Aberdeen, Scotland, 2018.
79. Chon, J.-W.; Kim, J.-W.; Song, K.-Y.; Lim, J.-S.; Bae, D.; Kim, H.; Seo, K.-H. Fate and Survival of *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia Coli* O157:H7 during Ripening of Cheddar Cheeses Manufactured from Unpasteurized Raw Milk. *LWT* **2020**, *133*, 109944. [[CrossRef](#)]
80. Gill, A.; Oudit, D. Enumeration of *Escherichia Coli* O157 in Outbreak-Associated Gouda Cheese Made with Raw Milk. *J. Food Prot.* **2015**, *78*, 1733–1737. [[CrossRef](#)]
81. Bonanno, L.; Delubac, B.; Michel, V.; Auvray, F. Influence of Stress Factors Related to Cheese-Making Process and to STEC Detection Procedure on the Induction of Stx Phages from STEC O26:H11. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 296. [[CrossRef](#)]
82. Lopez, C. Focus on the Supramolecular Structure of Milk Fat in Dairy Products. *Reprod. Nutr. Dev.* **2005**, *45*, 497–511. [[CrossRef](#)]
83. Kim, H.H.; Jimenez-Flores, R. Heat-Induced Interactions between the Proteins of Milk Fat Globule Membrane and Skim Milk. *J. Dairy Sci.* **1995**, *78*, 24–35. [[CrossRef](#)]
84. Sharma, S.K.; Dalgleish, D.G. Interactions between Milk Serum Proteins and Synthetic Fat Globule Membrane during Heating of Homogenized Whole Milk. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1407–1412. [[CrossRef](#)]
85. Lopez, C.; Cauty, C.; Guyomarç'h, F. Organization of Lipids in Milks, Infant Milk Formulas and Various Dairy Products: Role of Technological Processes and Potential Impacts. *Dairy Sci. Technol.* **2015**, *95*, 863–893. [[CrossRef](#)]
86. Pieters, R.J. Carbohydrate Mediated Bacterial Adhesion. In *Bacterial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics*; Linke, D., Goldman, A., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2011; pp. 227–240. ISBN 978-94-007-0940-9.
87. Keenan, T.W.; Dylewski, D.P.; Woodford, T.A.; Ford, R.H. Origin of Milk Fat Globules and the Nature of the Milk Fat Globule Membrane. In *Developments in Dairy Chemistry—2*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1983; Volume 2, pp. 83–118.
88. Douëllou, T.; Galia, W.; Kerangart, S.; Marchal, T.; Milhau, N.; Bastien, R.; Bouvier, M.; Buff, S.; Montel, M.-C.; Sergentet-Thevenot, D. Milk Fat Globules Hamper Adhesion of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* to Enterocytes: In Vitro and In Vivo Evidence. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 947. [[CrossRef](#)]

89. Brewster, J.D.; Paul, M. Short Communication: Improved Method for Centrifugal Recovery of Bacteria from Raw Milk Applied to Sensitive Real-Time Quantitative PCR Detection of *Salmonella* spp. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 3375–3379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. D'Incecco, P.; Faoro, F.; Silvetti, T.; Schrader, K.; Pellegrino, L. Mechanisms of Clostridium Tyrobutyricum Removal through Natural Creaming of Milk: A Microscopy Study. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 5164–5172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Laloy, E.; Vuillemand, J.-C.; El Soda, M.; Simard, R.E. Influence of the Fat Content of Cheddar Cheese on Retention and Localization of Starters. *Int. Dairy J.* **1996**, *6*, 729–740. [[CrossRef](#)]
92. Oberg, C.J.; Wr, M.; Dj, M. Microstructure of Mozzarella Cheese during Manufacture. *Food Struct.* **1993**, *12*, 251–258.
93. Pitino, L.; Randazzo, C.L.; Cross, K.L.; Parker, M.L.; Bisignano, C.; Wickham, M.S.J.; Mandalari, G.; Caggia, C. Survival of Lactobacillus Rhamnosus Strains Inoculated in Cheese Matrix during Simulated Human Digestion. *Food Microbiol.* **2012**, *31*, 57–63. [[CrossRef](#)]
94. Brisson, G.; Payken, H.F.; Sharpe, J.P.; Jiménez-Flores, R. Characterization of Lactobacillus Reuteri Interaction with Milk Fat Globule Membrane Components in Dairy Products. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5612–5619. [[CrossRef](#)]
95. Lopez, C.; Maillard, M.-B.; Briard-Bion, V.; Camier, B.; Hannon, J.A. Lipolysis during Ripening of Emmental Cheese Considering Organization of Fat and Preferential Localization of Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5855–5867. [[CrossRef](#)]
96. Sun, L.; Dicksved, J.; Priyashantha, H.; Lundh, Å.; Johansson, M. Distribution of Bacteria between Different Milk Fractions, Investigated Using Culture-Dependent Methods and Molecular-Based and Fluorescent Microscopy Approaches. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 1028–1037. [[CrossRef](#)]
97. Burdikova, Z.; Svindrych, Z.; Hickey, C.; Wilkinson, M.G.; Auty, M.A.E.; Samek, O.; Bernatova, S.; Krzyzanek, V.; Periasamy, A.; Sheehan, J.J. Application of Advanced Light Microscopic Techniques to Gain Deeper Insights into Cheese Matrix Physico-Chemistry. *Dairy Sci. Technol.* **2015**, *95*, 687–700. [[CrossRef](#)]
98. Hickey, C.D.; Sheehan, J.J.; Wilkinson, M.G.; Auty, M.A.E. Growth and Location of Bacterial Colonies within Dairy Foods Using Microscopy Techniques: A Review. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 99. [[CrossRef](#)]
99. Klančnik, A.; Šimunović, K.; Stermiša, M.; Ramić, D.; Smole Možina, S.; Bucar, F. Anti-Adhesion Activity of Phytochemicals to Prevent Campylobacter Jejuni Biofilm Formation on Abiotic Surfaces. *Phytochem. Rev.* **2020**, *20*, 55–84. [[CrossRef](#)]
100. Asadi, A.; Razavi, S.; Talebi, M.; Gholami, M. A Review on Anti-Adhesion Therapies of Bacterial Diseases. *Infection* **2019**, *47*, 13–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Ofek, I.; Bayer, E.A.; Abraham, S.N. Bacterial Adhesion. In *The Prokaryotes: Human Microbiology*; Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 107–123. ISBN 978-3-642-30144-5.
102. Boks, N.P.; Kaper, H.J.; Norde, W.; Busscher, H.J.; van der Mei, H.C. Residence Time Dependent Desorption of Staphylococcus Epidermidis from Hydrophobic and Hydrophilic Substrata. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2008**, *67*, 276–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Hermansson, M. The DLVO Theory in Microbial Adhesion. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **1999**, *14*, 105–119. [[CrossRef](#)]
104. Bayouduh, S.; Othmane, A.; Mora, L.; Ben Ouada, H. Assessing Bacterial Adhesion Using DLVO and XDLVO Theories and the Jet Impingement Technique. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2009**, *73*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Achinas, S.; Charalampogiannis, N.; Euverink, G.J.W. A Brief Recap of Microbial Adhesion and Biofilms. *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 2801. [[CrossRef](#)]
106. Beloin, C.; Houry, A.; Froment, M.; Ghigo, J.-M.; Henry, N. A Short-Time Scale Colloidal System Reveals Early Bacterial Adhesion Dynamics. *PLoS Biol.* **2008**, *6*, e167. [[CrossRef](#)]
107. Katsikogianni, M.; Missirlis, Y. Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion to Biomaterials and of Techniques Used in Estimating Bacteria-Material Interactions. *cCM* **2004**, *8*, 37–57. [[CrossRef](#)]
108. Dunne, W.M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 155–166. [[CrossRef](#)]
109. van Loosdrecht, M.C.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A.J. The Role of Bacterial Cell Wall Hydrophobicity in Adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 1893–1897. [[CrossRef](#)]
110. Zita, A.; Hermansson, M. Determination of Bacterial Cell Surface Hydrophobicity of Single Cells in Cultures and in Wastewater in Situ. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *152*, 299–306. [[CrossRef](#)]
111. Berne, C.; Ellison, C.K.; Ducret, A.; Brun, Y.V. Bacterial Adhesion at the Single-Cell Level. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 616–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Krasowska, A.; Sigler, K. How Microorganisms Use Hydrophobicity and What Does This Mean for Human Needs? *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2014**, *4*, 112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Law, K.-Y. Water-Surface Interactions and Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity and Superhydrophobicity. *Pure Appl. Chem.* **2015**, *87*, 759–765. [[CrossRef](#)]
114. Chevalier, F.; Sommerer, N. Analytical Methods | Mass Spectrometric Methods. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 198–205. ISBN 978-0-12-374407-4.
115. Corredig, M.; Dalglish, D.G. Effect of Heating of Cream on the Properties of Milk Fat Globule Membrane Isolates. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2533–2540. [[CrossRef](#)]
116. Hong, Y.; Brown, D.G. Electrostatic Behavior of the Charge-Regulated Bacterial Cell Surface. *Langmuir* **2008**, *24*, 5003–5009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Klodzińska, E.; Szumski, M.; Dziubakiewicz, E.; Hryniewicz, K.; Skwarek, E.; Janusz, W.; Buszewski, B. Effect of Zeta Potential Value on Bacterial Behavior during Electrophoretic Separation. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 1590–1596. [[CrossRef](#)]
118. Ng, W. *Zeta Potential of Escherichia Coli DH5α Grown in Different Growth Media*; PeerJ Inc.: Corte Madera, CA, USA, 2018.

119. Lytle, D.A.; Rice, E.W.; Johnson, C.H.; Fox, K.R. Electrophoretic Mobilities of *Escherichia Coli* O157:H7 and Wild-Type *Escherichia Coli* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 3222–3225. [[CrossRef](#)]
120. Ukuku, D.O.; Fett, W.F. Relationship of Cell Surface Charge and Hydrophobicity to Strength of Attachment of Bacteria to Cantaloupe Rind†. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 1093–1099. [[CrossRef](#)]
121. Obeid, S.; Guyomarç'h, F.; Tanguy, G.; Leconte, N.; Rousseau, F.; Dolivet, A.; Leduc, A.; Wu, X.; Cauty, C.; Jan, G.; et al. The Adhesion of Homogenized Fat Globules to Proteins Is Increased by Milk Heat Treatment and Acidic PH: Quantitative Insights Provided by AFM Force Spectroscopy. *Food Res. Int.* **2019**, *129*, 108847. [[CrossRef](#)]
122. Michalski, M.-C.; Michel, F.; Sainmont, D.; Briard, V. Apparent ζ -Potential as a Tool to Assess Mechanical Damages to the Milk Fat Globule Membrane. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2002**, *23*, 23–30. [[CrossRef](#)]
123. Michalski, M.-C.; Camier, B.; Briard, V.; Leconte, N.; Gassi, J.-Y.; Goudéranche, H.; Michel, F.; Fauquant, J. The Size of Native Milk Fat Globules Affects Physico-Chemical and Functional Properties of Emmental Cheese. *Le Lait* **2004**, *84*, 343–358. [[CrossRef](#)]
124. Verma, A.; Ghosh, T.; Bhushan, B.; Packirisamy, G.; Navani, N.K.; Sarangi, P.P.; Ambatipudi, K. Characterization of Difference in Structure and Function of Fresh and Mastitic Bovine Milk Fat Globules. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0221830. [[CrossRef](#)]
125. Malik, P.; Danthine, S.; Paul, A.; Blecker, C. Physical-Chemical Properties of Milk Fat Globule Membrane at Different Stages of Isolation. *Sci. Bull. Ser. F Biotechnol.* **2015**, *19*, 154–159.
126. Azghani, A.O.; Clark, C.A. Bacterial Infection Process: An Overview. In *Regulation of the Inflammatory Response in Health and Disease*; Research Signpost: Thiruvananthapuram, India, 2009; pp. 37–55. ISBN 978-81-308-0372-2.
127. Kendall, K.; Roberts, A.D. Van Der Waals Forces Influencing Adhesion of Cells. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2015**, *370*, 20140078. [[CrossRef](#)]
128. Burgain, J.; Scher, J.; Francius, G.; Borges, F.; Corgneau, M.; Revol-Junelles, A.M.; Cailliez-Grimal, C.; Gaiani, C. Lactic Acid Bacteria in Dairy Food: Surface Characterization and Interactions with Food Matrix Components. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *213*, 21–35. [[CrossRef](#)]
129. Kiely, L.J.; Olson, N.F. The Physicochemical Surface Characteristics of *Lactobacillus Casei*. *Food Microbiol.* **2000**, *17*, 277–291. [[CrossRef](#)]
130. Kiely, L.J.; Olson, N.F. Short Communication: Estimate of Non Electrostatic Interaction Free Energy Parameters for Milk Fat Globules. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 3110–3112. [[CrossRef](#)]
131. Shoaf-Sweeney, K.D.; Hutkins, R.W. Chapter 2 Adherence, Anti-Adherence, and Oligosaccharides. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008; Volume 55, pp. 101–161. ISBN 978-0-12-374120-2.
132. Cho, S.-H.; Lee, K.M.; Kim, C.-H.; Kim, S.S. Construction of a Lectin–Glycan Interaction Network from Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* Strains by Multi-Omics Analysis. *IJMS* **2020**, *21*, 2681. [[CrossRef](#)]
133. Ielasi, F.S.; Alioscha-Perez, M.; Donohue, D.; Claes, S.; Sahli, H.; Schols, D.; Willaert, R.G. Lectin-Glycan Interaction Network-Based Identification of Host Receptors of Microbial Pathogenic Adhesins. *mBio* **2016**, *7*, e00584-16. [[CrossRef](#)]
134. Sharon, N.; Ofek, I. Microbial Lectins. In *Comprehensive Glycoscience-From Chemistry to Systems Biology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2007; pp. 623–659.
135. Nie, S.; Cui, S.W.; Xie, M. *Bioactive Polysaccharides*; Academic Press: London, UK; Elsevier: San Diego, CA, USA, 2018; ISBN 978-0-12-809418-1.
136. Chevalier, L.; Selim, J.; Genty, D.; Baste, J.M.; Piton, N.; Boukhalfa, I.; Hamzaoui, M.; Pareige, P.; Richard, V. Electron Microscopy Approach for the Visualization of the Epithelial and Endothelial Glycocalyx. *Morphologie* **2017**, *101*, 55–63. [[CrossRef](#)]
137. Varki, A. Biological Roles of Glycans. *Glycobiology* **2017**, *27*, 3–49. [[CrossRef](#)]
138. Monteiro, R.; Ageorges, V.; Rojas-Lopez, M.; Schmidt, H.; Weiss, A.; Bertin, Y.; Forano, E.; Jubelin, G.; Henderson, I.R.; Livrelli, V.; et al. A Secretome View of Colonisation Factors in Shiga Toxin-Encoding *Escherichia Coli* (STEC): From Enterohaemorrhagic *E. Coli* (EHEC) to Related Enteropathotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* **2016**, *363*, fnw179. [[CrossRef](#)]
139. Dhakal, B.K.; Bower, J.M.; Mulvey, M.A.; Yang, X.H. Pili, Fimbriae. In *Encyclopedia of Microbiology*, 4th ed.; Schmidt, T.M., Ed.; Academic Press: Oxford, UK, 2019; pp. 595–613. ISBN 978-0-12-811737-8.
140. Ross, S.A.; Lane, J.A.; Kilcoyne, M.; Joshi, L.; Hickey, R.M. Defatted Bovine Milk Fat Globule Membrane Inhibits Association of Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7 with Human HT-29 Cells. *Int. Dairy J.* **2016**, *59*, 36–43. [[CrossRef](#)]
141. Sánchez-Juanes, F.; Alonso, J.M.; Zancada, L.; Hueso, P. Glycosphingolipids from Bovine Milk and Milk Fat Globule Membranes: A Comparative Study. Adhesion to Enterotoxigenic *Escherichia Coli* Strains. *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 31–40. [[CrossRef](#)]
142. Novakovic, P.; Huang, Y.Y.; Lockerbie, B.; Shahriar, F.; Kelly, J.; Gordon, J.R.; Middleton, D.M.; Loewen, M.E.; Kidney, B.A.; Simko, E. Identification of *Escherichia Coli* F4ac-Binding Proteins in Porcine Milk Fat Globule Membrane. *Can. J. Vet. Res.* **2015**, *79*, 120–128.
143. Bergström, J.H.; Birchenough, G.M.H.; Katona, G.; Schroeder, B.O.; Schütte, A.; Ermund, A.; Johansson, M.E.V.; Hansson, G.C. Gram-Positive Bacteria Are Held at a Distance in the Colon Mucus by the Lectin-like Protein ZG16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 13833–13838. [[CrossRef](#)]
144. Barboza, M.; Pinzon, J.; Wickramasinghe, S.; Froehlich, J.W.; Moeller, I.; Smilowitz, J.T.; Ruhaak, L.R.; Huang, J.; Lönnnerdal, B.; German, J.B.; et al. Glycosylation of Human Milk Lactoferrin Exhibits Dynamic Changes During Early Lactation Enhancing Its Role in Pathogenic Bacteria-Host Interactions. *Mol. Cell Proteom.* **2012**, *11*, M111.015248. [[CrossRef](#)]
145. Ye, A.; Singh, H.; Taylor, M.; Anema, S. Interactions of Whey Proteins with Milk Fat Globule Membrane Proteins during Heat Treatment of Whole Milk. *Le Lait* **2004**, *84*, 269–283. [[CrossRef](#)]

146. Tailford, L.E.; Crost, E.H.; Kavanaugh, D.; Juge, N. Mucin Glycan Foraging in the Human Gut Microbiome. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 81. [\[CrossRef\]](#)
147. Josenhans, C.; Mütthing, J.; Elling, L.; Bartfeld, S.; Schmidt, H. How Bacterial Pathogens of the Gastrointestinal Tract Use the Mucosal Glyco-Code to Harness Mucus and Microbiota: New Ways to Study an Ancient Bag of Tricks. *Int. J. Med. Microbiol.* **2020**, *310*, 151392. [\[CrossRef\]](#)
148. Harvey, K.L.; Jarocki, V.M.; Charles, I.G.; Djordjevic, S.P. The Diverse Functional Roles of Elongation Factor Tu (EF-Tu) in Microbial Pathogenesis. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2351. [\[CrossRef\]](#)
149. Bao, J.; Pan, G.; Poncz, M.; Wei, J.; Ran, M.; Zhou, Z. Serpin Functions in Host-Pathogen Interactions. *PeerJ* **2018**, *6*, e4557. [\[CrossRef\]](#)
150. He, X.; Zhang, W.; Chang, Q.; Su, Z.; Gong, D.; Zhou, Y.; Xiao, J.; Drelich, A.; Liu, Y.; Popov, V.; et al. A New Role for Host Annexin A2 in Establishing Bacterial Adhesion to Vascular Endothelial Cells: Lines of Evidence from Atomic Force Microscopy and an in Vivo Study. *Lab. Investig.* **2019**, *99*, 1650–1660. [\[CrossRef\]](#)
151. Li, X.; Pei, G.; Zhang, L.; Cao, Y.; Wang, J.; Yu, L.; Dianjun, W.; Gao, S.; Zhang, Z.-S.; Yao, Z.; et al. Compounds Targeting YadC of Uropathogenic *Escherichia Coli* and Its Host Receptor Annexin A2 Decrease Bacterial Colonization in Bladder. *EBioMedicine* **2019**, *50*, 23–33. [\[CrossRef\]](#)
152. Rand, J.H.; Wu, X.-X.; Lin, E.Y.; Griffel, A.; Gialanella, P.; McKittrick, J.C. Annexin A5 Binds to Lipopolysaccharide and Reduces Its Endotoxin Activity. *mBio* **2012**, *3*, e00292-11. [\[CrossRef\]](#)
153. Hari-Dass, R.; Shah, C.; Meyer, D.J.; Raynes, J.G. Serum Amyloid A Protein Binds to Outer Membrane Protein A of Gram-Negative Bacteria. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 18562–18567. [\[CrossRef\]](#)
154. Beck, W.H.J.; Adams, C.P.; Biglang-awa, I.M.; Patel, A.B.; Vincent, H.; Haas-Stapleton, E.J.; Weers, P.M.M. Apolipoprotein A-I Binding to Anionic Vesicles and Lipopolysaccharides: Role for Lysine Residues in Antimicrobial Properties. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 1503–1510. [\[CrossRef\]](#)
155. Han, Q.; Han, Y.; Wen, H.; Pang, Y.; Li, Q. Molecular Evolution of Apolipoprotein Multigene Family and the Original Functional Properties of Serum Apolipoprotein (LAL2) in *Lampetra Japonica*. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1751. [\[CrossRef\]](#)
156. Huang, Y.; Hui, K.; Jin, M.; Yin, S.; Wang, W.; Ren, Q. Two Endoplasmic Reticulum Proteins (Calnexin and Calreticulin) Are Involved in Innate Immunity in Chinese Mitten Crab (*Eriocheir Sinensis*). *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27578. [\[CrossRef\]](#)
157. van Harten, R.M.; van Woudenbergh, E.; van Dijk, A.; Haagsman, H.P. Cathelicidins: Immunomodulatory Antimicrobials. *Vaccines* **2018**, *6*, 63. [\[CrossRef\]](#)
158. Baranova, I.N.; Kurlander, R.; Bocharov, A.V.; Vishnyakova, T.G.; Chen, Z.; Remaley, A.T.; Csako, G.; Patterson, A.P.; Eggerman, T.L. Role of Human CD36 in Bacterial Recognition, Phagocytosis and Pathogen-Induced C-Jun N-Terminal Kinase (JNK)-Mediated Signaling. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 7147–7156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
159. Martinez, V.G.; Escoda-Ferran, C.; Tadeu Simões, I.; Arai, S.; Orta Mascaró, M.; Carreras, E.; Martínez-Florensa, M.; Yelamos, J.; Miyazaki, T.; Lozano, F. The Macrophage Soluble Receptor AIM/Api6/CD5L Displays a Broad Pathogen Recognition Spectrum and Is Involved in Early Response to Microbial Aggression. *Cell Mol. Immunol.* **2014**, *11*, 343–354. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
160. Collins, J.; van Pijkeren, J.-P.; Svensson, L.; Claesson, M.J.; Sturme, M.; Li, Y.; Cooney, J.C.; van Sinderen, D.; Walker, A.W.; Parkhill, J.; et al. Fibrinogen-Binding and Platelet-Aggregation Activities of a *Lactobacillus Salivarius* Septicaemia Isolate Are Mediated by a Novel Fibrinogen-Binding Protein. *Mol. Microbiol.* **2012**, *85*, 862–877. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
161. Foster, T.J. The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. *Trends Microbiol.* **2019**, *27*, 927–941. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
162. Hymes, J.P.; Klaenhammer, T.R. Stuck in the Middle: Fibronectin-Binding Proteins in Gram-Positive Bacteria. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1504. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
163. Ko, Y.-P.; Flick, M.J. Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in *Staphylococcus Aureus* Infection. *Semin. Thromb Hemost* **2016**, *42*, 408–421. [\[CrossRef\]](#)
164. Oh, Y.J.; Hubauer-Brenner, M.; Gruber, H.J.; Cui, Y.; Traxler, L.; Siligan, C.; Park, S.; Hinterdorfer, P. Curli Mediate Bacterial Adhesion to Fibronectin via Tensile Multiple Bonds. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33909. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
165. Pizarro-Cerdá, J.; Cossart, P. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell* **2006**, *124*, 715–727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
166. Vasta, G.R. Roles of Galectins in Infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 424–438. [\[CrossRef\]](#)
167. Bucki, R.; Byfield, F.J.; Kulakowska, A.; McCormick, M.E.; Drozdowski, W.; Namiot, Z.; Hartung, T.; Janney, P.A. Extracellular Gelsolin Binds Lipoteichoic Acid and Modulates Cellular Response to Proinflammatory Bacterial Wall Components. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 4936–4944. [\[CrossRef\]](#)
168. Hoffmann, C.; Ohlsen, K.; Hauck, C.R. Integrin-Mediated Uptake of Fibronectin-Binding Bacteria. *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90*, 891–896. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
169. Krukonis, E.S.; Isberg, R.R. Microbial Pathogens and Integrin Interactions. In *Integrin-Ligand Interaction*; Springer: Boston, MA, USA, 1997; pp. 175–197. ISBN 978-1-4757-4066-0.
170. Scibelli, A.; Roperto, S.; Manna, L.; Pavone, L.M.; Tafuri, S.; Morte, R.D.; Staiano, N. Engagement of Integrins as a Cellular Route of Invasion by Bacterial Pathogens. *Vet. J.* **2007**, *173*, 482–491. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
171. Ulanova, M.; Gravelle, S.; Barnes, R. The Role of Epithelial Integrin Receptors in Recognition of Pulmonary Pathogens. *J. Innate Immun.* **2008**, *1*, 4–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

172. Shahriar, F.; Ngeleka, M.; Gordon, J.R.; Simko, E. Identification by Mass Spectroscopy of F4ac-Fimbrial-Binding Proteins in Porcine Milk and Characterization of Lactadherin as an Inhibitor of F4ac-Positive *Escherichia Coli* Attachment to Intestinal Villi in Vitro. *Dev. Comp. Immunol.* **2006**, *30*, 723–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Vazquez-Juarez, R.C.; Romero, M.J.; Ascencio, F. Adhesive Properties of a LamB-like Outer-Membrane Protein and Its Contribution to *Aeromonas Veronii* Adhesion. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 700–708. [[CrossRef](#)]
174. Peiser, L.; Gough, P.J.; Kodama, T.; Gordon, S. Macrophage Class A Scavenger Receptor-Mediated Phagocytosis of *Escherichia Coli*: Role of Cell Heterogeneity, Microbial Strain, and Culture Conditions In Vitro. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 1953–1963. [[CrossRef](#)]
175. Naughton, J.; Duggan, G.; Bourke, B.; Clyne, M. Interaction of Microbes with Mucus and Mucins. *Gut Microbes* **2014**, *5*, 48–52. [[CrossRef](#)]
176. Iovino, F.; Engelen-Lee, J.-Y.; Brouwer, M.; van de Beek, D.; van der Ende, A.; Valls Seron, M.; Mellroth, P.; Muschiol, S.; Bergstrand, J.; Widengren, J.; et al. P1gR and PECAM-1 Bind to Pneumococcal Adhesins RrgA and PspC Mediating Bacterial Brain Invasion. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 1619–1630. [[CrossRef](#)]
177. Johansen, F.-E.; Kaetzel, C.S. Regulation of the Polymeric Immunoglobulin Receptor and IgA Transport: New Advances in Environmental Factors That Stimulate P1gR Expression and Its Role in Mucosal Immunity. *Mucosal Immunol.* **2011**, *4*, 598–602. [[CrossRef](#)]
178. Lee, B.; Bowden, G.H.W.; Myal, Y. Identification of Mouse Submaxillary Gland Protein in Mouse Saliva and Its Binding to Mouse Oral Bacteria. *Arch. Oral Biol.* **2002**, *47*, 327–332. [[CrossRef](#)]
179. Schenkels, L.C.P.M.; Walgreen-Weterings, E.; Oomen, L.C.J.M.; Bolscher, J.G.M.; Veerman, E.C.I.; Nieuw Amerongen, A.V. In Vivo Binding of the Salivary Glycoprotein EP-GP (Identical to GCDFFP-15) to Oral and Non-Oral Bacteria Detection and Identification of EP-GP Binding Species. *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 83–88. [[CrossRef](#)]
180. Lu, X.; Wang, M.; Qi, J.; Wang, H.; Li, X.; Gupta, D.; Dziarski, R. Peptidoglycan Recognition Proteins Are a New Class of Human Bactericidal Proteins. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 5895–5907. [[CrossRef](#)]
181. Green, R.S.; Naimi, W.A.; Oliver, L.D.; O'Bier, N.; Cho, J.; Conrad, D.H.; Martin, R.K.; Marconi, R.T.; Carlyon, J.A. Binding of Host Cell Surface Protein Disulfide Isomerase by *Anaplasma Phagocytophilum* Asp14 Enables Pathogen Infection. *mBio* **2020**, *11*, e03141-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Kawasaki, T.; Kawai, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Mossman, K.L.; Mian, M.F.; Lauzon, N.M.; Gyles, C.L.; Lichty, B.; Mackenzie, R.; Gill, N.; Ashkar, A.A. Cutting Edge: FimH Adhesin of Type 1 Fimbriae Is a Novel TLR4 Ligand. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 6702–6706. [[CrossRef](#)]
184. Oliveira-Nascimento, L.; Massari, P.; Wetzler, L.M. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 79. [[CrossRef](#)]
185. Tükel, Ç.; Nishimori, J.H.; Wilson, R.P.; Winter, M.G.; Keestra, A.M.; van Putten, J.P.M.; Bäuml, A.J. Toll-like Receptors 1 and 2 Cooperatively Mediate Immune Responses to Curli, a Common Amyloid from Enterobacterial Biofilms. *Cell Microbiol.* **2010**, *12*, 1495–1505. [[CrossRef](#)]
186. Pak, J.; Pu, Y.; Zhang, Z.T.; Hasty, D.L.; Wu, X.R. Tamm-Horsfall Protein Binds to Type 1 Fimbriated *Escherichia Coli* and Prevents *E. Coli* from Binding to Uroplakin Ia and Ib Receptors. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9924–9930. [[CrossRef](#)]
187. Yanagihara, S.; Kanaya, T.; Fukuda, S.; Nakato, G.; Hanazato, M.; Wu, X.-R.; Yamamoto, N.; Ohno, H. Uromodulin-SlpA Binding Dictates *Lactobacillus Acidophilus* Uptake by Intestinal Epithelial M Cells. *Int. Immunol.* **2017**, *29*, 357–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Mak, T.N.; Brüggemann, H. Vimentin in Bacterial Infections. *Cells* **2016**, *5*, 18. [[CrossRef](#)]
189. Singh, B.; Su, Y.-C.; Riesbeck, K. Vitronectin in Bacterial Pathogenesis: A Host Protein Used in Complement Escape and Cellular Invasion. *Mol. Microbiol.* **2010**, *78*, 545–560. [[CrossRef](#)]
190. Baik, J.E.; Choe, H.-I.; Hong, S.W.; Kang, S.-S.; Ahn, K.B.; Cho, K.; Yun, C.-H.; Han, S.H. Human Salivary Proteins with Affinity to Lipoteichoic Acid of *Enterococcus Faecalis*. *Mol. Immunol.* **2016**, *77*, 52–59. [[CrossRef](#)]
191. Gomand, F.; Borges, F.; Guerin, J.; El-Kirat-Chatel, S.; Francius, G.; Dumas, D.; Burgain, J.; Gaiani, C. Adhesive Interactions Between Lactic Acid Bacteria and β -Lactoglobulin: Specificity and Impact on Bacterial Location in Whey Protein Isolate. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1512. [[CrossRef](#)]
192. Guerin, J.; Bacharouche, J.; Burgain, J.; Lebeer, S.; Francius, G.; Borges, F.; Scher, J.; Gaiani, C. Pili of *Lactobacillus Rhamnosus* GG Mediate Interaction with β -Lactoglobulin. *Food Hydrocoll.* **2016**, *58*, 35–41. [[CrossRef](#)]
193. Mather, I.H. Milk Lipids | Milk Fat Globule Membrane. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 680–690. ISBN 978-0-12-374407-4.
194. Yang, M.; Cong, M.; Peng, X.; Wu, J.; Wu, R.; Liu, B.; Ye, W.; Yue, X. Quantitative Proteomic Analysis of Milk Fat Globule Membrane (MFGM) Proteins in Human and Bovine Colostrum and Mature Milk Samples through ITRAQ Labeling. *Food Funct.* **2016**, *7*, 2438–2450. [[CrossRef](#)]
195. Bachiero, D.; Uson, S.; Jim  n, R. Lipid Binding Characterization of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90* (Suppl. S1), 490.
196. Zhang, L.; García-Cano, I.; Jiménez-Flores, R. Characterization of Adhesion between *Limosilactobacillus Reuteri* and Milk Phospholipids by Density Gradient and Gene Expression. *JDS Commun.* **2020**, *1*, 29–35. [[CrossRef](#)]
197. Janganan, T.K.; Mullin, N.; Tzokov, S.B.; Stringer, S.; Fagan, R.P.; Hobbs, J.K.; Moir, A.; Bullough, P.A. Characterization of the Spore Surface and Exosporium Proteins of *Clostridium Sporogenes*; Implications for *Clostridium Botulinum* Group I Strains. *Food Microbiol.* **2016**, *59*, 205–212. [[CrossRef](#)]

198. Shuster, B.; Khemmani, M.; Nakaya, Y.; Holland, G.; Iwamoto, K.; Abe, K.; Imamura, D.; Maryn, N.; Driks, A.; Sato, T.; et al. Expansion of the Spore Surface Polysaccharide Layer in *Bacillus Subtilis* by Deletion of Genes Encoding Glycosyltransferases and Glucose Modification Enzymes. *J. Bacteriol.* **2019**, *201*, e00321-19. [[CrossRef](#)]
199. D'Incecco, P.; Ong, L.; Pellegrino, L.; Faoro, F.; Barbiroli, A.; Gras, S. Effect of Temperature on the Microstructure of Fat Globules and the Immunoglobulin-Mediated Interactions between Fat and Bacteria in Natural Raw Milk Creaming. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 2984–2997. [[CrossRef](#)]
200. LeBouder, E.; Rey-Nores, J.E.; Raby, A.-C.; Affolter, M.; Vidal, K.; Thornton, C.A.; Labéta, M.O. Modulation of Neonatal Microbial Recognition: TLR-Mediated Innate Immune Responses Are Specifically and Differentially Modulated by Human Milk. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 3742–3752. [[CrossRef](#)]
201. Honkanen-Buzalski, T.; Sandholm, M. Association of Bovine Secretory Immunoglobulins with Milk Fat Globule Membranes. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **1981**, *4*, 329–342. [[CrossRef](#)]
202. Schrotten, H.; Bosch, M.; Nobis-Bosch, R.; Köhler, H.; Hanisch, F.G.; Plogmann, R. Secretory Immunoglobulin A Is a Component of the Human Milk Fat Globule Membrane. *Pediatr. Res.* **1999**, *45*, 82–86. [[CrossRef](#)]
203. Korhonen, H.; Marnila, P.; Gill, H.S. Bovine Milk Antibodies for Health. *Br. J. Nutr.* **2000**, *84*, 135–146. [[CrossRef](#)]
204. Mitra, A.K.; Mahalanabis, D.; Ashraf, H.; Unicomb, L.; Eeckels, R.; Tzipori, S. Hyperimmune Cow Colostrum Reduces Diarrhoea Due to Rotavirus: A Double-Blind, Controlled Clinical Trial. *Acta Paediatr.* **1995**, *84*, 996–1001. [[CrossRef](#)]
205. Tawfeek, H.I.; Najim, N.H.; Al-Mashikhi, S. Efficacy of an Infant Formula Containing Anti-*Escherichia Coli* Colostral Antibodies from Hyperimmunized Cows in Preventing Diarrhea in Infants and Children: A Field Trial. *Int. J. Infect. Dis.* **2003**, *7*, 120–128. [[CrossRef](#)]
206. Adachi, E.; Tanaka, H.; Toyoda, N.; Takeda, T. Detection of bactericidal antibody in the breast milk of a mother infected with enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7. *Kansenshogaku Zasshi* **1999**, *73*, 451–456. [[CrossRef](#)]
207. Noguera-Obenza, M.; Ochoa, T.J.; Gomez, H.F.; Guerrero, M.L.; Herrera-Insua, I.; Morrow, A.L.; Ruiz-Palacios, G.; Pickering, L.K.; Guzman, C.A.; Cleary, T.G. Human Milk Secretory Antibodies against Attaching and Effacing *Escherichia Coli* Antigens. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 545–551. [[CrossRef](#)]
208. Funatogawa, K.; Ide, T.; Kirikae, F.; Saruta, K.; Nakano, M.; Kirikae, T. Use of Immunoglobulin Enriched Bovine Colostrum against Oral Challenge with Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7 in Mice. *Microbiol. Immunol.* **2002**, *46*, 761–766. [[CrossRef](#)]
209. Funatogawa, K.; Tada, T.; Kuwahara-Arai, K.; Kirikae, T.; Takahashi, M. Enriched Bovine IgG Fraction Prevents Infections with Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7, *Salmonella* Enterica Serovar Enteritidis, and *Mycobacterium Avium*. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 2726–2730. [[CrossRef](#)]
210. Rabinovitz, B.C.; Gerhardt, E.; Tironi Farinati, C.; Abdala, A.; Galarza, R.; Vilde, D.A.; Ibarra, C.; Cataldi, A.; Mercado, E.C. Vaccination of Pregnant Cows with EspA, EspB, γ -Intimin, and Shiga Toxin 2 Proteins from *Escherichia Coli* O157:H7 Induces High Levels of Specific Colostral Antibodies That Are Transferred to Newborn Calves. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 3318–3326. [[CrossRef](#)]
211. de Oliveira, I.R.; Bessler, H.C.; Bao, S.N.; del Lima, R.; Giugliano, L.G. Inhibition of Enterotoxigenic *Escherichia Coli* (ETEC) Adhesion to Caco-2 Cells by Human Milk and Its Immunoglobulin and Non-Immunoglobulin Fractions. *Braz. J. Microbiol.* **2007**, *38*, 86–92. [[CrossRef](#)]
212. Atroshi, F.; Alaviuhkola, T.; Schildt, R.; Sandholm, M. Fat Globule Membrane of Sow Milk as a Target for Adhesion of K88-Positive *Escherichia Coli*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **1983**, *6*, 235–245. [[CrossRef](#)]
213. Mulder, H.; Walstra, P. *The Milk Fat Globule*; Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal: Slough, UK, 1974; ISBN 0-85198-289-1.
214. Geer, S.R.; Barbano, D.M. The Effect of Immunoglobulins and Somatic Cells on the Gravity Separation of Fat, Bacteria, and Spores in Pasteurized Whole Milk. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 2027–2038. [[CrossRef](#)]
215. Hansen, S.F.; Larsen, L.B.; Wiking, L. Thermal Effects on IgM-Milk Fat Globule-Mediated Agglutination. *J. Dairy Res.* **2019**, *86*, 108–113. [[CrossRef](#)]
216. Turula, H.; Wobus, C.E. The Role of the Polymeric Immunoglobulin Receptor and Secretory Immunoglobulins during Mucosal Infection and Immunity. *Viruses* **2018**, *10*, 237. [[CrossRef](#)]
217. Zhang, W.; Xu, L.; Park, H.-B.; Hwang, J.; Kwak, M.; Lee, P.C.W.; Liang, G.; Zhang, X.; Xu, J.; Jin, J.-O. *Escherichia Coli* Adhesion Portion FimH Functions as an Adjuvant for Cancer Immunotherapy. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1187. [[CrossRef](#)]
218. Rapsinski, G.J.; Newman, T.N.; Oppong, G.O.; van Putten, J.P.M.; Tükel, Ç. CD14 Protein Acts as an Adaptor Molecule for the Immune Recognition of *Salmonella* Curli Fibers. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 14178–14188. [[CrossRef](#)]
219. Lenehan, D.; Murray, A.; Smith, S.; Uhlin, B.E.; Mitchell, J. Characterisation of *E. Coli* Lipopolysaccharide Adherence to Platelet Receptors. *Blood* **2016**, *128*, 4906. [[CrossRef](#)]
220. Li, B.; Liu, H.; Wang, W. Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Escherichia Coli* O157:H7 and Screening for Non-O157 Shiga Toxin-Producing *E. Coli*. *BMC Microbiol.* **2017**, *17*, 215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
221. Miszczycha, S.D.; Ganet, S.; Duniere, L.; Rozand, C.; Loukiadis, E.; Thevenot-Sergentet, D. Novel Real-Time PCR Method to Detect *Escherichia Coli* O157:H7 in Raw Milk Cheese and Raw Ground Meat. *J. Food Prot.* **2012**, *75*, 1373–1381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
222. Martens, E.C.; Neumann, M.; Desai, M.S. Interactions of Commensal and Pathogenic Microorganisms with the Intestinal Mucosal Barrier. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 457. [[CrossRef](#)]
223. Stinson, L.F.; Ma, J.; Rea, A.; Dymock, M.; Geddes, D.T. Centrifugation Does Not Remove Bacteria from the Fat Fraction of Human Milk. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

224. Park, J.Y.; Lim, M.-C.; Park, K.; Ok, G.; Chang, H.-J.; Lee, N.; Park, T.J.; Choi, S.-W. Detection of *E. Coli* O157:H7 in Food Using Automated Immunomagnetic Separation Combined with Real-Time PCR. *Processes* **2020**, *8*, 908. [CrossRef]
225. Yang, D.; Wang, Y.; Zhao, L.; Rao, L.; Liao, X. Extracellular PH Decline Introduced by High Pressure Carbon Dioxide Is a Main Factor Inducing Bacteria to Enter Viable but Non-Culturable State. *Food Res. Int.* **2022**, *151*, 110895. [CrossRef]
226. Quigley, L.; O'Sullivan, O.; Beresford, T.P.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Cotter, P.D. A Comparison of Methods Used to Extract Bacterial DNA from Raw Milk and Raw Milk Cheese. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, 96–105. [CrossRef]
227. Giffel, M.T.; Horst, H.V.D. Comparison between Bactofugation and Microfiltration Regarding Efficiency of Somatic Cell and Bacteria Removal. *Bull. Int. Dairy Fed.* **2004**, *389*, 49–53.
228. Bagel, A.; Université de Lyon, Lyon, France; Douëllou, T.; Université de Lyon, Lyon, France; Sergentet, D.; Université de Lyon, Lyon, France. Distribution of *Escherichia coli* in bovine raw milk by creaming assay. Unpublished work. 2019.
229. Anderson, J.F. The Relative Proportion Of Bacteria In Top Milk (Cream Layer) And Bottom Milk (Skim Milk), and Its Bearing On Infant Feeding. *J. Infect. Dis.* **1909**, *6*, 392–400. [CrossRef]
230. Bird, J. Cream Separation. *Int. J. Dairy Technol.* **1991**, *44*, 61–63. [CrossRef]
231. Kahane, I.; Ofek, I. *Toward Anti-Adhesion Therapy for Microbial Diseases*; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012; ISBN 978-1-4613-0415-9.
232. Orth, K.; Krachler, A.-M. Made to Stick: Anti-Adhesion Therapy for Bacterial Infections: A Major Advantage in Targeting Adhesion Is That the Body Clears Invading Pathogens Instead of Killing Them. *Microbe Mag.* **2013**, *8*, 286–290. [CrossRef]
233. Sharon, N. Carbohydrates as Future Anti-Adhesion Drugs for Infectious Diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 527–537. [CrossRef] [PubMed]
234. Horemans, T.; Kerstens, M.; Clais, S.; Struijs, K.; van den Abbeele, P.; Assche, T.V.; Maes, L.; Cos, P. Evaluation of the Anti-Adhesive Effect of Milk Fat Globule Membrane Glycoproteins on *Helicobacter Pylori* in the Human NCI-N87 Cell Line and C57BL/6 Mouse Model. *Helicobacter* **2012**, *17*, 312–318. [CrossRef]
235. Kvistgaard, A.S.; Pallesen, L.T.; Arias, C.F.; López, S.; Petersen, T.E.; Heegaard, C.W.; Rasmussen, J.T. Inhibitory Effects of Human and Bovine Milk Constituents on Rotavirus Infections. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 4088–4096. [CrossRef]
236. Martín-Sosa, S.; Martín, M.-J.; Hueso, P. The Sialylated Fraction of Milk Oligosaccharides Is Partially Responsible for Binding to Enterotoxigenic and Uropathogenic *Escherichia Coli* Human Strains. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3067–3072. [CrossRef] [PubMed]
237. Schrotten, H.; Hanisch, F.G.; Plogmann, R.; Hacker, J.; Uhlenbruck, G.; Nobis-Bosch, R.; Wahn, V. Inhibition of Adhesion of S-Fimbriated *Escherichia Coli* to Buccal Epithelial Cells by Human Milk Fat Globule Membrane Components: A Novel Aspect of the Protective Function of Mucins in the Nonimmunoglobulin Fraction. *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 2893–2899. [CrossRef] [PubMed]
238. Simon, P.M.; Goode, P.L.; Mobasser, A.; Zopf, D. Inhibition of *Helicobacter Pylori* Binding to Gastrointestinal Epithelial Cells by Sialic Acid-Containing Oligosaccharides. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 750–757. [CrossRef]
239. Sprong, R.C.; Hulstein, M.F.E.; Lambers, T.T.; van der Meer, R. Sweet Buttermilk Intake Reduces Colonisation and Translocation of *Listeria Monocytogenes* in Rats by Inhibiting Mucosal Pathogen Adherence. *Br. J. Nutr.* **2012**, *108*, 2026–2033. [CrossRef]
240. Wang, X.; Hirno, S.; Wadström, T.; Willén, R. Inhibition of *Helicobacter Pylori* Infection by Bovine Milk Glycoconjugates in a BALB/cA Mouse Model. *J. Med. Microbiol.* **2001**, *50*, 430–435. [CrossRef] [PubMed]
241. Manoni, M.; Di Lorenzo, C.; Ottoboni, M.; Tretola, M.; Pinotti, L. Comparative Proteomics of Milk Fat Globule Membrane (MFGM) Proteome across Species and Lactation Stages and the Potentials of MFGM Fractions in Infant Formula Preparation. *Foods* **2020**, *9*, 1251. [CrossRef]
242. Hernell, O.; Timby, N.; Domellöf, M.; Lönnnerdal, B. Clinical Benefits of Milk Fat Globule Membranes for Infants and Children. *J. Pediatr.* **2016**, *173*, S60–S65. [CrossRef] [PubMed]
243. Lee, H.; Padhi, E.; Hasegawa, Y.; Larke, J.; Parenti, M.; Wang, A.; Hernell, O.; Lönnnerdal, B.; Slupsky, C. Compositional Dynamics of the Milk Fat Globule and Its Role in Infant Development. *Front. Pediatr.* **2018**, *6*, 313. [CrossRef]
244. da Silva, R.C.; Colleran, H.L.; Ibrahim, S.A. Milk Fat Globule Membrane in Infant Nutrition: A Dairy Industry Perspective. *J. Dairy Res.* **2021**, *88*, 105–116. [CrossRef] [PubMed]
245. Timby, N.; Domellöf, M.; Lönnnerdal, B.; Hernell, O. Supplementation of Infant Formula with Bovine Milk Fat Globule Membranes. *Adv. Nutr.* **2017**, *8*, 351–355. [CrossRef] [PubMed]

Chapitre 2

Pathogénie et physiopathologie des STEC

Ce deuxième chapitre apporte des notions complémentaires, à la revue de la littérature présentée en Chapitre 1, sur les STEC. La pathogénie et la physiopathologie des infections à STEC sont détaillées.

A. Généralités concernant les STEC

A.1. L'espèce *Escherichia coli* : du bénéfique à la pathogénicité

Les *Escherichia coli* (*E. coli*) sont des bactéries à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* en forme de bâtonnets aux extrémités arrondies (bacilles) (**Figure 1**). La véritable forme des *E. coli* peut varier de cellules sphériques à filamenteuses. Ces bacilles mesurent entre 2 à 6 μm de long et 1 à 1,5 μm de large (Percival and Williams, 2014). Ce sont des bactéries aérobies, anaérobies facultatives, mésophiles et asporulées. *E. coli* est généralement mobile grâce à l'action de flagelles péritriches (**Figure 1-B**). Les *Escherichia coli* sont des bactéries commensales de l'intestin des vertébrés et paradoxalement, elles peuvent aussi être responsables d'infections intra- et extra-intestinales humaines et animales (Tenaillon et al., 2010). Dans la majorité des cas, *E. coli* vit en tant que microorganisme commensal, dans une association mutuellement bénéfique avec son hôte.

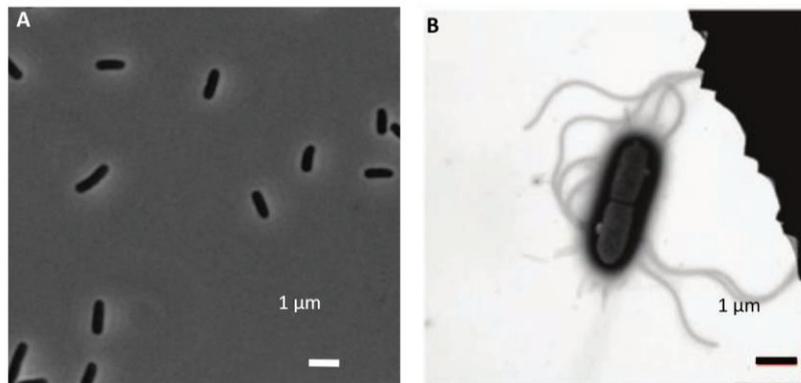


Figure 1. Cellules d'*Escherichia coli* observées par microscopie à contraste de phase (**A**) (adaptée de Tavaddod and Naderi-Manesh, 2017) ou par microscopie électronique à transmission (**B**) (adaptée de Jauffred et al., 2017). Les *E. coli* sont des bacilles (2 à 6 μm de long et 1 à 1,5 μm de large) mobiles grâce à leurs flagelles.

Certaines souches d'*E. coli* ont acquis des facteurs de virulence lors de transferts horizontaux de gènes (éléments transposables, bactériophages, plasmides...) ou de mutations génétiques (Bozcal, 2019). Les produits des gènes de virulence contribuent à la pathogénie de la bactérie. L'acquisition de facteurs de virulence offre ainsi à la bactérie de nouveaux outils pour entrer, se multiplier et persister dans un site de l'hôte normalement stérile et inaccessible aux bactéries. Grâce à certains facteurs de virulence, les bactéries peuvent aussi échapper au système immunitaire de l'hôte ou encore entrer en compétition pour les nutriments. Les facteurs de virulence décrits chez *E. coli* affectent un large éventail de processus cellulaires eucaryotes comme la signalisation cellulaire, la sécrétion d'ions, la synthèse protéique, la

mitose ou encore le remodelage du cytosquelette, pour n'en citer que quelques-uns (Kaper et al., 2004). Bien que la bactérie *Escherichia coli* soit l'une des plus étudiées, plusieurs lacunes importantes subsistent en ce qui concerne son écologie, son histoire naturelle et l'émergence de la virulence chez cette espèce.

Les *E. coli* pathogènes sont classifiés selon leur site d'infection, l'absence/présence des gènes de virulence et les signes cliniques observés chez les malades. En fonction des facteurs de virulence acquis par la souche, 7 pathotypes de *E. coli* diarrhéiques ont pu être identifiés (Croxen et al., 2013). Parmi eux, les STEC sont des souches particulières d'*E. coli* produisant des protéines cytotoxiques pour les cellules eucaryotes, les shiga toxines (Stx). Les shiga toxines 1 et 2 (Stx1/2) sont des toxines protéiques bactériennes, codées par les gènes *stx1* ou *stx2*, portés par un prophage et constituent le facteur de virulence déterministe du pathotype STEC. Cette toxine est connue également sous l'appellation vérotoxines en raison de sa cytotoxicité pour les cellules Véro (Gyles, 1992), ou shiga-like toxine.

A.2. Définition et classification des STEC

D'après le Codex Alimentarius¹, les STEC sont un « *vaste groupe très diversifié de souches bactériennes d'Escherichia coli dont il est prouvé qu'elles portent les gènes de shiga-toxines (stx) et produisent des protéines de shiga-toxines (Stx)* » (FAO and WHO, 2021). Bien que la communauté scientifique reconnaisse clairement le gène *stx* comme le facteur déterministe du pathotype STEC, cette classification regroupe beaucoup de souches génétiquement différentes (catégorie « b » de la **Figure 2**). D'autres critères ont été proposés pour affiner la classification des souches dont la présence de certains gènes, les sérogroupes des souches et l'origine de l'isolement de la souche.

De nombreux isolats STEC (Stx+) portent également le gène *eae* (catégorie « c » de la **Figure 2**) sur le « *Locus of Enterocyte Effacement* » (LEE). Le gène *eae* code pour l'intimine, une protéine bactérienne adhésive impliquée dans la formation de lésions distinctives, les lésions d'attachement-effacement (A/E), à la surface des cellules épithéliales intestinales.

¹ Le « Codex Alimentarius ou « Code alimentaire » est un ensemble de normes, de lignes directrices et de codes d'usages adoptés par la Commission du Codex Alimentarius. La Commission a été créée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) afin de protéger la santé des consommateurs et de promouvoir des pratiques loyales en matière de commerce de denrées alimentaires. Elle est l'élément central du Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires (<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/fr/>)

Cette lésion est aussi caractéristique des souches EPEC/AEEC¹ qui possèdent également le locus LEE (*eae*+) mais pas le gène *stx* (*stx*-) (catégories « I » et « a », respectivement de la Figure 2).

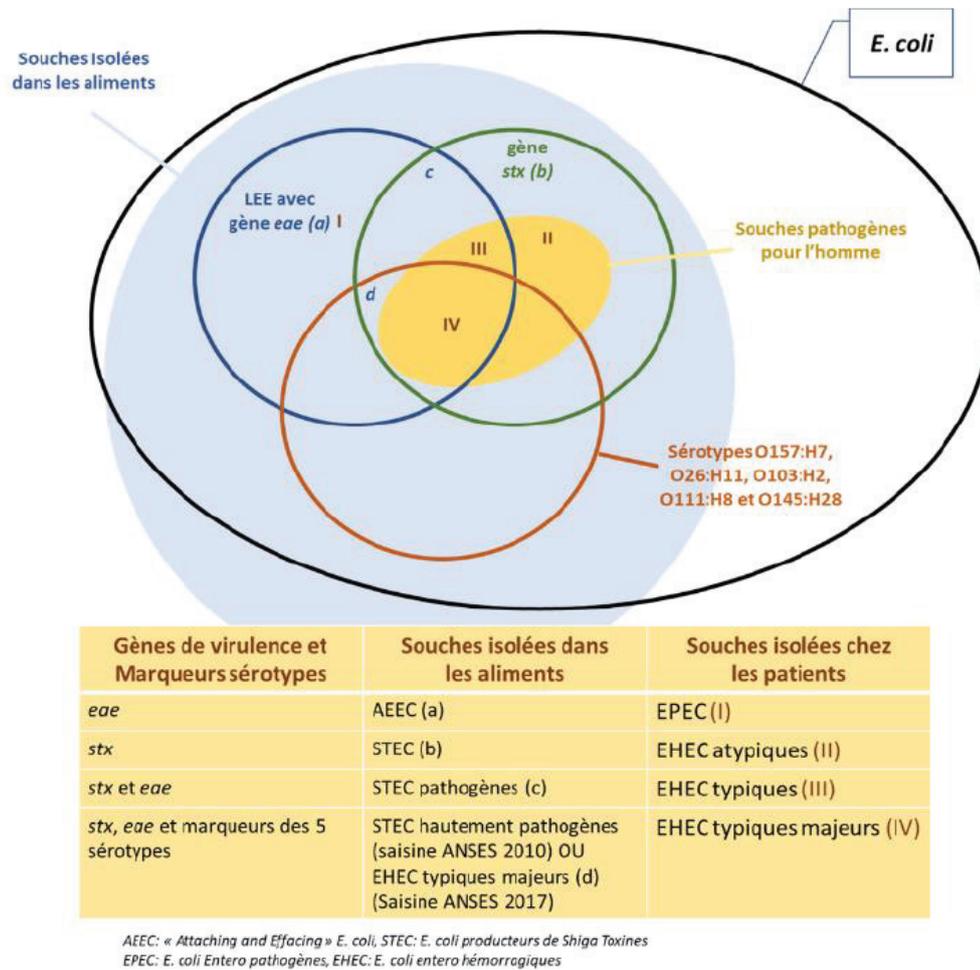


Figure 2. Classification des STEC selon les gènes de virulence, les sérotypes et l'origine de l'isolement de la souche (aliments ou patients). Les *Escherichia coli* sont une vaste espèce de bactéries commensales dont certaines souches peuvent être pathogènes pour l'homme, dont celles appartenant au pathotype STEC. La combinaison de la présence des gènes *stx* et *eae* ainsi que des marqueurs moléculaires relatifs à certains sérotypes (O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28) est utilisé comme critère de nomenclature. En fonction de l'origine de l'isolement de la souche (aliments ou patients), la nomenclature est différente (adaptée de la Plateforme de Surveillance de la Chaîne Alimentaire, 2022).

¹ Les EPEC pour 'Enteropathogenic *E. coli*' (*E. coli* entéropathogènes) sont un autre pathotype d'*E. coli* pour l'Homme. Ces souches sont appelées AEEC pour 'Attaching and Effacing *E. coli*' (*E. coli* attachant/effaçant) lors qu'elles ont été isolées d'une matrice alimentaire.

Dans le cadre de l'évaluation du risque ou en épidémiologie, les souches STEC appartenant à certains sérotypes ont plus souvent été associées à des cas graves d'infections humaines (Jones et al., 2020; EFSA and ECDC, 2021). Le sérotype est caractérisé par le type d'antigène O exposé au niveau de la paroi cellulaire bactérienne. L'antigène O est un polysaccharide qui forme la partie externe du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif (**Figure 3-A**). Cet antigène se compose de multiples unités répétitives d'oligosaccharides (unités O) comportant chacune deux à sept résidus provenant d'une large gamme de sucres ; plus de 197 antigènes O ont été identifiés (Liu et al., 2020). L'association du sérotype avec l'un des 53 types d'antigènes flagellaires, l'antigène H (numéroté de 1 à 56 ; les types H13, H22, et H50 ne sont pas utilisés), définit le sérotype (Fratamico et al., 2016). La flagelline, codée par le gène *fliC*, est la protéine qui constitue le faisceau hélicoïde du flagelle (**Figure 3-B**). La région centrale de la flagelline est hautement variable et sa composition en acides aminés permet de discriminer chaque antigène (Hu and Reeves, 2020).

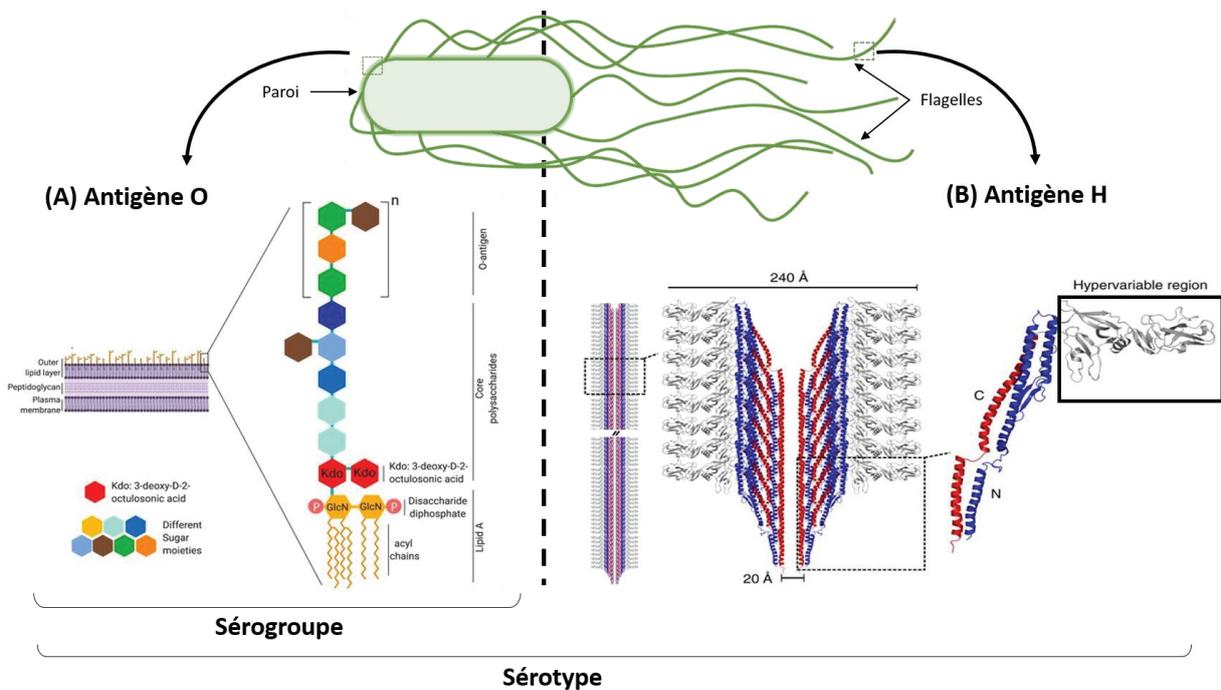


Figure 3. Les antigènes O et H d'*Escherichia coli*. L'antigène O est porté par la partie externe du lipopolysaccharide (LPS), un composant essentiel de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif (**A** ; adaptée de Mazgaeen and Gurung, 2020). L'antigène H est porté par la flagelline qui constitue le faisceau hélicoïde du flagelle (**B** ; adaptée de Eckhard et al., 2017).

Concernant les STEC, plus de 470 sérotypes ont été identifiés et près de 130 ont été associés à des infections humaines (Zhang et al., 2022). Les sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28 sont les plus communément impliqués dans de graves cas d'infections. Les souches STEC portant le gène *eae* et appartenant à ces sérotypes sont considérées par l'ANSES¹ comme des souches STEC hautement pathogènes (catégorie « d » de la **Figure 2**) ou des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) typiques majeurs.

A.3. Distinction STEC et EHEC

La distinction entre STEC et EHEC est assez fine et varie selon les pays. En France, elle tend à être harmonisée (ANSES, 2017).

Depuis 2008, l'ANSES définissait le nom des souches « STEC » en fonction des facteurs de virulence des souches et l'origine de leur isolement (humaine ou alimentaire). L'ANSES estimait qu'étant donné les faibles connaissances disponibles sur la pathogénicité des STEC, on ne pouvait les considérer comme des EHEC que si elles avaient été isolées de cas humains. Une distinction était également faite en fonction du sérotype de la souche (STEC pathogène ou hautement pathogène). Depuis, différents travaux ont montré qu'il n'y avait pas de différence dans les principales propriétés de virulence des isolats STEC de matrices alimentaires par rapport aux isolats humains (Douëllou et al., 2017a).

Ainsi, depuis sa dernière saisine en 2017, l'ANSES considère que les souches d'*E. coli* qui possèdent les gènes *eae* et *stx* sont des EHEC typiques, qu'elles soient isolées de cas humains ou d'aliments. Néanmoins, la distinction des souches en fonction de leur sérotype existe toujours : celles qui appartiennent aux 5 sérotypes les plus impliqués dans des épidémies les souches (Top 5) sont appelées EHEC typiques majeurs (**Figure 2**).

Cependant, l'utilisation des termes 'STEC' et 'EHEC' est largement controversée. En effet, selon l'EFSA² la terminologie « EHEC » est obsolète (Koutsoumanis et al., 2020). A l'échelle mondiale, le groupe d'experts mandaté par l'OMS³ et la FAO⁴ a convenu dans son dernier rapport d'utiliser uniquement le terme STEC. Selon leurs propos : « *le groupe d'experts a convenu d'utiliser uniquement le terme STEC car il inclut les EHEC et parce que l'interaction*

¹ L'agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail française

² *The European Food Safety Authority* (L'Autorité européenne de sécurité des aliments)

³ L'Organisation Mondiale pour la Santé

⁴ L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA ; plus connu sous signe anglais FAO pour *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

entre les facteurs de virulence connus et putatifs des STEC et le potentiel pathogène des souches individuelles n'est pas entièrement résolu » (FAO and WHO, 2018).

Par soucis d'homogénéité et de facilité de lecture, le terme générique STEC a été employé le long du manuscrit.

A.4. Critères de pathogénicité des STEC

Les symptômes humains (diarrhée, diarrhée hémorragique, syndrome hémolytique et urémique) faisant suite à une infection à STEC varient en fonction des hôtes mais également des gènes de virulence portés par la souche. Dans le cadre d'évaluation des risques, différents travaux ont tenté d'associer la présence de gènes avec des symptômes humains.

Le gène *stx* est fréquemment détecté dans les isolats de matrices alimentaires, les prélèvements de surface ou d'environnement de la ferme. Un récent rapport de l'EFSA indique que toutes les souches d'*E. coli* qui portent le gène *stx* sont pathogènes (Koutsoumanis et al., 2020). D'autres travaux distinguent les symptômes en fonction des gènes de virulence portés par les souches. À titre d'exemple, le dernier avis de l'ANSES en date de 2017 repose sur le risque de développer certains symptômes en fonction des souches *stx+*. Selon cette classification, toutes les souches STEC sont potentiellement pathogènes, mais le risque de causer une forme grave d'infection est accentué par la combinaison de la présence des gènes *eae*, *aaiC* ou *aggR* et du sérotype (ANSES, 2017). Les maladies liées aux STEC peuvent entraîner une diarrhée, une diarrhée sanglante ou un syndrome hémolytique et urémique. Une classification en trois niveaux de pathogénicité est proposée sur la base de données épidémiologiques (**Tableau 1**).

Tableau 1. Classification des souche Stx+ selon leur risque pour la santé publique en France (d'après ANSES, 2017).

Groupe	Gènes	Sérogroupe	Risque de Diarrhée	Risque de SHU / Colite hémorragique
I	<i>stx+</i> <i>eae</i> + ou (<i>aaiC</i> et <i>aggR</i>)+	O157, O26, O103, O145, O111, O104, O80	élevé	élevé
II	<i>stx</i> + <i>eae</i> + ou (<i>aaiC</i> et <i>aggR</i>)+	tout autre sérotype	élevé	potentiel
III	<i>stx</i> + <i>eae</i> - et (<i>aaiC</i> et <i>aggR</i>)-	tout autre sérotype	potentiel	potentiel

De leur côté, l’OMS et la FAO rappellent que « *les données relatives aux sérotypes des souches de STEC ne sont pas fiables pour prédire le risque et le potentiel des STEC à provoquer des maladies graves* » et que « *le risque et la gravité des infections à STEC sont mieux prédits en utilisant les facteurs de virulence (gènes) des STEC* » (FAO and WHO, 2018). Ils ajoutent également que « *les facteurs humains, tels que la santé, la génétique et les personnes immunodéprimées peuvent affecter la gravité des résultats dans les infections à STEC* ». Non spécifié par l’ANSES, l’OMS précise aussi que le sous-type Stx2a de la toxine peut être un facteur prédictif de la virulence de souches. Dans son rapport, le groupe JEMRA¹ précise que « *l’association de sous-types stx autres que stx2a avec le développement d’un SHU est moins concluante et varie en fonction d’autres facteurs, tels que la sensibilité de l’hôte, la charge pathogène et le traitement antibiotique* » (The Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment (JEMRA), 2019). Ce groupe d’experts recommande de se référer au sous-type du gène *stx* et/ou présence du gène *eae* pour déterminer les objectifs de gestion des risques de la santé publique, de surveillance par les autorités compétentes et d’enquêtes de santé publique en cas de test positif sur une matrice alimentaire (**Tableau 2**).

Tableau 2. Gènes de virulence des souches STEC isolées et le risque associé de diarrhée (D), diarrhée sanglante (DS) et/ou syndrome hémolytique et urémique (SHU) (d’après FAO and WHO, 2021).

Niveau	Attributs génétiques	Risque de :
1	<i>stx2a +eae</i> ou <i>aggR</i>	D/DS /SHU
2	<i>stx2d</i>	D/DS /SHU (selon le fond génétique de la souche)
3	<i>stx2c +eae</i>	D/DS (SHU rare)
4	<i>stx1a +eae</i>	D/DS (SHU rare)
5	Autres sous-types <i>stx</i>	D (DS et SHU rare)

¹ The Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment

B. Processus infectieux des STEC

Le processus infectieux des STEC est un déroulement complexe d'étapes successives qui impliquent la régulation de nombreux gènes pour la survie, l'adhésion et la colonisation intestinale des cellules bactériennes. L'implantation des STEC à la barrière intestinale humaine, dans la section terminale de l'iléon et dans le colon (Croxen et al., 2013) entraîne un déséquilibre physiologique et des dommages biologiques conséquents, sans compter l'action des shiga toxines. Une compréhension fine des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie¹ et la pathogénèse² des infections à STEC est fondamentale pour le développement de nouvelles stratégies de lutte contre ce pathogène. Le processus infectieux des STEC peut se généraliser en trois phases : (i) l'ingestion et la survie des cellules jusqu'au site d'infection ; (ii) l'adhésion et la colonisation de la muqueuse intestinale ; et (iii) la libération de shiga toxines.

B.1. Entrée et survie des STEC jusqu'à l'épithélium intestinal

B.1.1. Voie d'entrée et ingestion

Les bactéries présentes dans les aliments suivent le même chemin que les produits ingérés. Elles entrent par la bouche, franchissent l'œsophage et atteignent l'estomac puis l'intestin (**Figure 4**). Le déclenchement d'une infection nécessite l'ingestion d'une quantité suffisante de cellules bactériennes pour provoquer la maladie. La dose infectieuse estimée des STEC est faible (de 10 à 100 cellules) et varie selon les souches, le type d'aliment et la susceptibilité de l'hôte (Betts, 2000; AFSSA, 2003; Etcheverría and Padola, 2013; The Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment (JEMRA), 2019). La quantité de cellules ingérée peut aussi avoir des conséquences sur la gravité de la maladie (The Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment (JEMRA), 2019).

Les humains ont des barrières protectrices pour limiter la pénétration de microorganismes dans leur organisme et limiter les déséquilibres physiologiques que peut engendrer une infection. Les bactéries ingérées sont alors soumises à différents mécanismes restrictifs tout au long du système digestif dont l'acidité de l'estomac, la bile et les sécrétions intestinales dont le mucus et des anticorps.

¹ Étude des troubles fonctionnels d'un organisme ou d'un système organique et de ses réactions au cours d'une maladie (CNRTL).

² Mécanisme de déclenchement et d'évolution d'un processus pathologique (CNRTL).

Par exemple, *E. coli* dispose d'au moins cinq systèmes de résistance à l'acide basés sur des réactions enzymatiques (AR1 à AR5 ; Acid Resistance) (Zhao and Houry, 2010) et complété par des systèmes de protéines chaperonnes (HdeA et HdeB) protégeant les protéines périplasmiques (Jubelin et al., 2018). À titre de comparaison, les STEC présentent une résistance à l'acidité plus forte que les salmonelles (Cabrera-Diaz et al., 2009). Ainsi, la dose infectieuse nécessaire pour engendrer une infection est beaucoup plus élevée pour *Salmonella* que pour les STEC. Cette résistance à l'acide est un trait de virulence essentiel de l'infection à STEC et aux entéropathogènes, plus généralement.

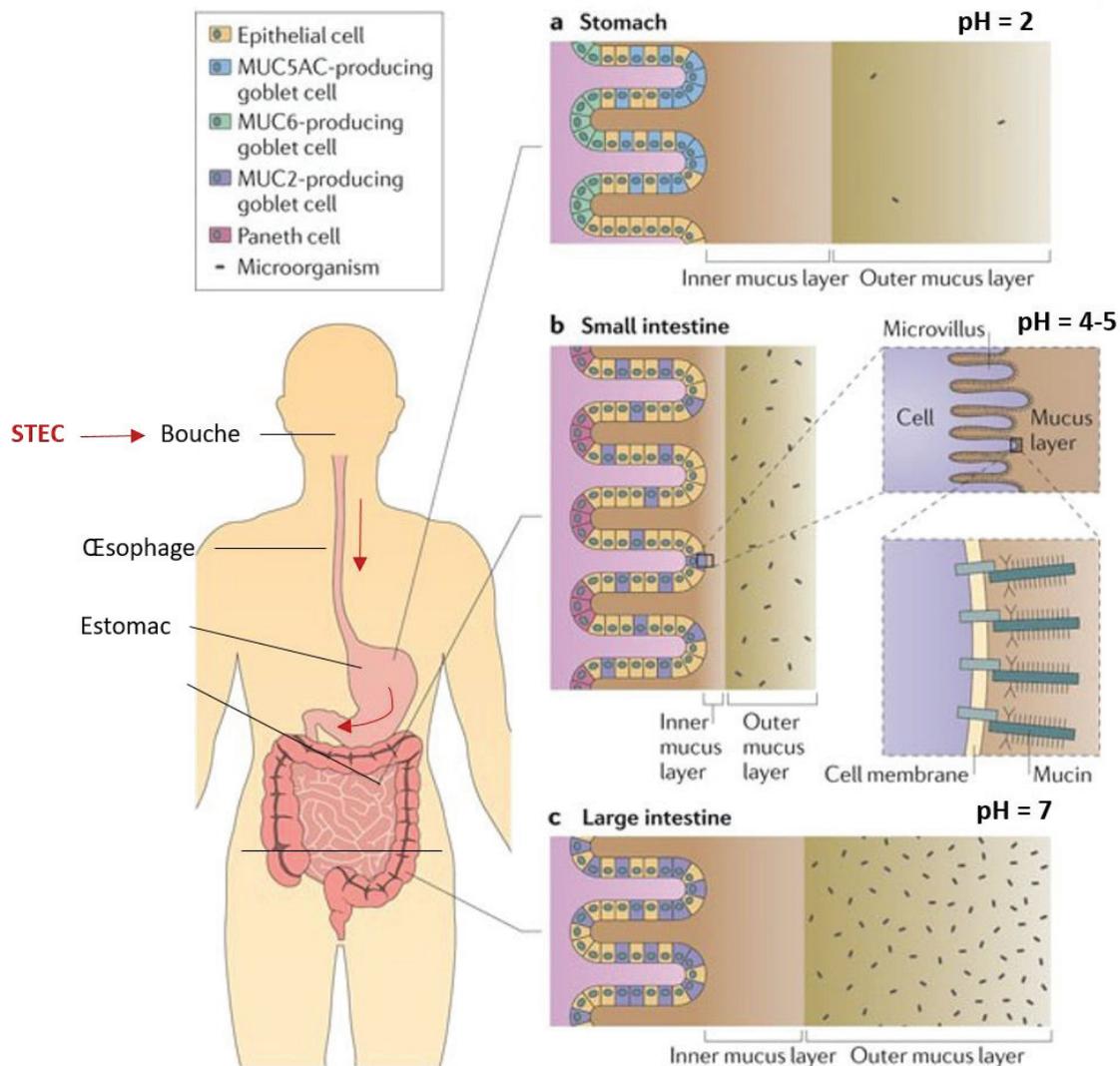


Figure 4. Ingestion de cellules STEC lors de consommation d'un aliment contaminé, son parcours à travers l'appareil digestif humain et schéma de la muqueuse intestinale et de l'estomac (adaptée de McGuckin et al., 2011). Dans l'appareil digestif, les bactéries sont piégées dans la couche supérieure de mucus, les maintenant à distance de l'épithélium intestinal.

B.1.2. Le colon

Une fois passé l'estomac, les STEC continuent leur chemin à travers l'appareil digestif et arrivent au niveau de l'intestin. L'intestin est un long tube de 7 à 8 m divisé en deux régions principales : (i) le petit intestin ou l'intestin grêle (environ 3 à 6 m) et (ii) le gros intestin ou le côlon (entre 1 et 1,5 m), chacune décomposée en plusieurs zones (**Figure 4**). La colonisation des STEC se produit préférentiellement au niveau de l'épithélium de l'iléon terminal et du côlon (Chong et al., 2007). Le colon comporte plusieurs parties (le caecum, le colon ascendant, le colon transverse, le colon descendant et le colon sigmoïde) et toutes présentent la même structure histologique à savoir, une muqueuse, une sous muqueuse, une musculuse et une séreuse (**Figure 5**).

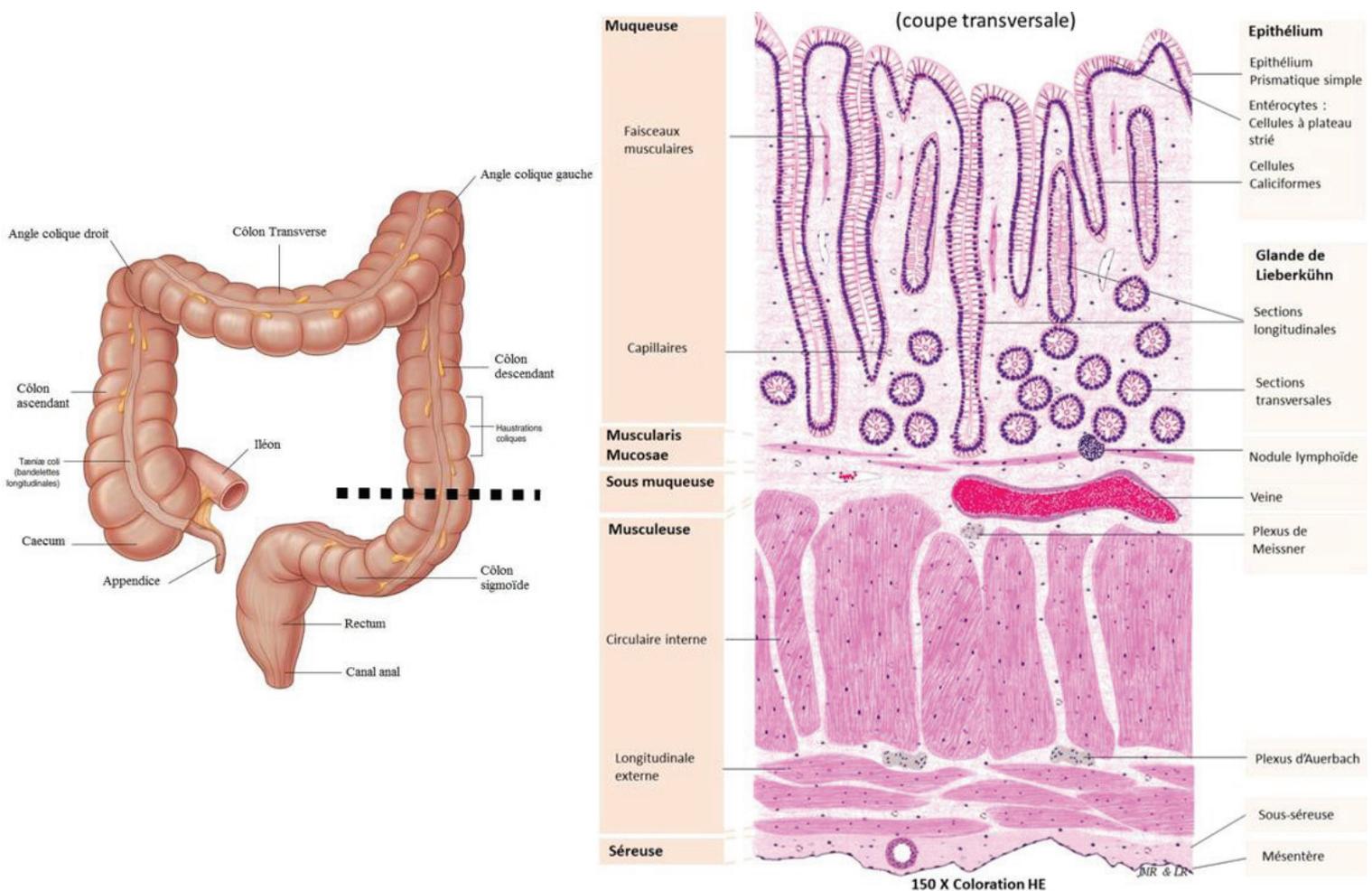


Figure 5. Organisation anatomique et schéma histologie d'une coupe transversale du côlon (d'après Corvaisier, 2016; Université de Montpellier). Le gros intestin ou le côlon mesure entre 1 et 1,5 mètre de long pour un diamètre moyen de 7 cm. Il se compose de plusieurs zones, à savoir le caecum, le colon ascendant, le colon transverse, le colon descendant et le colon sigmoïde. Le colon absorbe l'eau et les éléments nutritifs de la nourriture digérée et fait passer les déchets (les matières fécales) dans le rectum, évacués par la suite par l'anus.

La muqueuse colique est dépourvue de replis et de villosités. Elle est composée (i) d'un épithélium simple, tapissé d'une couche de mucus qui forme une barrière protectrice contre les microorganismes extérieurs, (ii) du chorion et de la (iii) muscularis mucosae (**Figure 5**). Le chorion est formé d'un tissu conjonctif lâche, abondamment infiltré de lymphocytes, de glandes de Lieberkühn, composées principalement de cellules caliciformes qui sécrètent le mucus, ainsi que de capillaires sanguins.

La couche de mucus n'est pas homogène le long du tube digestif mais présente globalement la même composition biologique (**Figure 4**). La couche de mucus du colon est caractérisée par une couche interne (*inner layer*) pratiquement exempte de bactéries et une couche externe (*outer layer*) moins définie qui comprend des bactéries intestinales et des matières alimentaires (Hansson and Johansson, 2010).

Six types de cellules matures composent l'épithélium intestinal humain et possèdent des fonctions absorbantes (les entérocytes et les cellules M) ou sécrétoires (les cellules de Paneth, les cellules en gobelet, les cellules de Truft et les entéroendocrines) (Allaire et al., 2018; Gehart and Clevers, 2019). Les cellules en gobelet ou cellules caliciformes sont spécialisées dans la sécrétion de mucines, les glycoprotéines majoritaires du mucus (**Figure 4 et Figure 5**).

Concrètement, le mucus n'a pas de réelles propriétés antimicrobiennes. En association avec d'autres composants biologiques tels que des protéines, des lipides, des oligosaccharides, des ions, des débris cellulaires et l'ADN libre (Leal et al., 2017), les mucines sécrétées agissent comme un piège en maintenant les bactéries à une distance sûre de l'épithélium intestinal (Bergström et al., 2016; Schroeder, 2019). Hautement glycosylées, les mucines présentent des épitopes glucidiques, principalement de type O-glycanes, pouvant servir de site d'attachement aux bactéries (Derrien et al., 2010; Juge, 2012). Les bactéries se servent de structures de surface spécialisées dans l'adhésion, comme les pili et les flagelles, pour s'ancrer aux mucines (Jensen et al., 2014; Sicard et al., 2017).

Bloquées dans le mucus, les STEC doivent franchir cette barrière pour éviter d'être emportés avec le bol alimentaire et être excrétés. Certaines entérobactéries présentent ainsi la capacité de se frayer un passage à travers la couche de mucus grâce à des mucinases ou en inhibant directement la production de mucines (Sicard et al., 2017) (**Figure 6**). Par exemple, la protéine StcE, une métalloprotéase qui reconnaît spécifiquement des substrats contenant des α -O-glycanes ancrés aux mucines, est exprimée par certaines souches STEC (Yu et al., 2012).

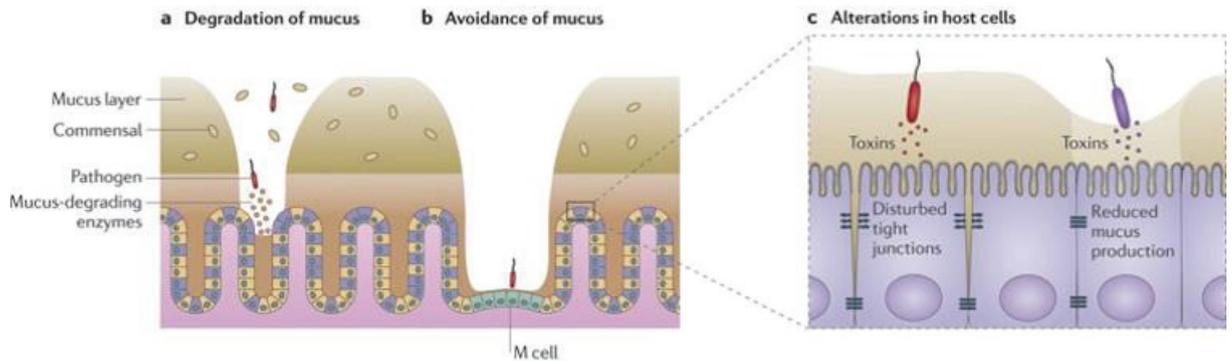


Figure 6. Franchissement du mucus par les bactéries pathogènes par dégradation enzymatique **(a)**, via les cellules M qui ne sont pas recouvertes d'une épaisse couche de mucus **(b)**, ou en perturbant la production de mucus par des toxines spécialisées **(c)** (adaptée de McGuckin et al., 2011).

B.2. L'adhésion et la multiplication des STEC

B.2.1. Généralités

Une fois la couche de mucus franchie, l'attachement des STEC aux cellules cibles de l'épithélium intestinal de l'hôte peut se produire. L'adhésion est une étape bien régulée sous l'influence d'une combinaison de signaux externes tels que l'accès aux nutriments, la présence d'autres bactéries, le contact avec une surface ainsi que des facteurs abiotiques comme le pH, la force ionique, la température et la disponibilité en oxygène (Berne et al., 2018; Jubelin et al., 2018). Lorsque les STEC atteignent la couche de mucus interne, les gènes liés à la motilité et à la virulence sont exprimés, tandis qu'une fois l'adhésion établie, ces gènes sont régulés à la baisse et les gènes d'adhésion sont régulés à la hausse (Martinez de la Peña et al., 2016).

L'adhésion bactérienne est généralement décrite comme la première étape du processus infectieux, bien que les étapes discutées précédemment jouent un rôle non négligeable dans le devenir et la prévention d'infections liées aux entéropathogènes. L'adhésion d'une bactérie à une cellule ou une surface permet son ancrage et limite le risque d'être éliminée par les mécanismes de défense de l'hôte. C'est une étape clé pour les bactéries, leur permettant, une fois attachées, de coloniser l'épithélium intestinal.

Au sein d'une même espèce, la diversité bactérienne est surprenante et affecte de manière significative le tropisme tissulaire. Le tropisme tissulaire fait référence à la capacité des souches à reconnaître des motifs spécifiques des tissus et des cellules de l'hôte. Toutes les bactéries ne peuvent pas reconnaître tous les épitopes exposés à la surface des cellules eucaryotes car cette propriété dépend de leur bagage génétique et des adhésines qu'elles expriment.

Avant un contact spécifique, complémentaire et intime entre les cellules, une étape non spécifique est engagée par l'action des forces attractives (interactions hydrophobes, attractions électrostatiques et forces de Van der Waals) (**Figure 7-A**). Quant à l'adhésion spécifique, deux facteurs sont nécessaires : un récepteur et un ligand, tous deux complémentaires et présents à la surface de la bactérie et à la surface de la cellule cible. Cette description est quelque peu réductrice ; les mécanismes d'adhésion sont d'une grande diversité et de multiples mécanismes agissent en synergie pour réaliser une adhésion complète, en fonction des propriétés de l'hôte et de la bactérie.

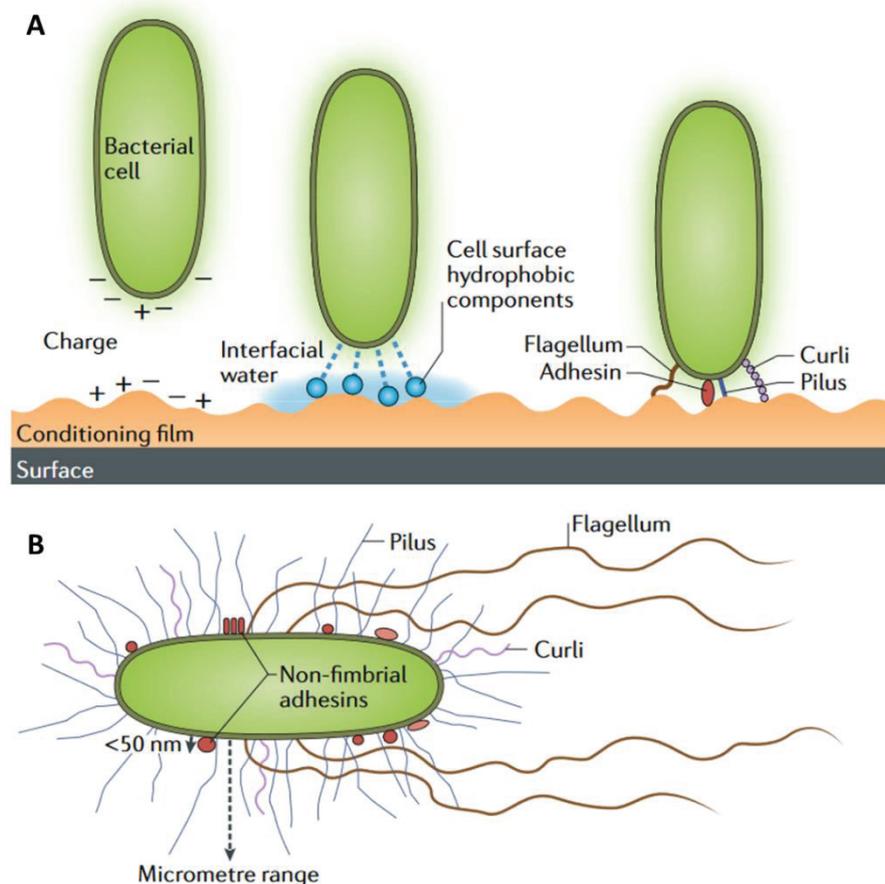


Figure 7. Schéma des premières interactions entre une surface et une bactérie (**A**) et les structures de la surface bactérienne impliquées (**B**). Une fois la cellule bactérienne proche d'une surface, le processus d'adhésion débute. Les cellules bactériennes sont généralement chargées négativement alors que les surfaces cibles peuvent être assez diversifiées, créant un phénomène répulsif si des forces contraires sont trop importantes. A la surface cible, une couche d'eau peut agir comme une barrière à la fixation des bactéries. Les composants hydrophobes de la surface bactérienne, tels que des protéines et des polysaccharides extracellulaires, peuvent déplacer ces molécules d'eau et renforcer les interactions hydrophobes. Une fois la bactérie suffisamment proche de la surface (de l'ordre du nanomètre), les adhésines et les appendices extracellulaires des bactéries, comme les flagelles, les pili et les curli, interagissent avec la surface cible. Les adhésines fimbriales sont plus longues et peuvent s'étendre à l'échelle du micromètre (adaptée de Berne et al., 2018).

En général, les récepteurs bactériens reconnaissent des fragments oligosaccharidiques ou des résidus peptidiques spécifiques à la surface de la cellule cible. Trois grands types d'interactions adhésine-récepteur ont été décrits : lectine-glycane, protéine-protéine et hydrophobine-protéine (Shoaf- Sweeney and Hutkins, 2008). La nature des adhésines est vaste : porines, glycoprotéines, glycolipides, lipoprotéines, autotransporteurs et appendices extracellulaires (fimbriae) ont été documentés (Paulsson and Riesbeck, 2018). La **Figure 7-B** présente des structures de la surface bactérienne fréquemment impliquées dans l'adhésion aux surfaces.

Il n'existe pas de consensus sur la classification des adhésines ce qui parfois peut entraîner de la confusion. Une classification selon la morphologie, la séquence protéique, la sérologie a été précédemment utilisée (Thanassi et al., 2007). D'autres auteurs présentent les adhésines selon la machinerie de sécrétion et d'assemblage utilisée (Gerlach and Hensel, 2007). Une classification de type « fimbriale » (relatif à de longs filaments des bactéries) ou « non-fimbriale » est également proposée, mais comprend aussi des structures extracellulaires non impliquées dans l'adhésion comme les pili sexuels, et exclut des structures plus complexes comme le flagelle (Aleksandrowicz et al., 2021). Une classification à deux niveaux, selon que la structure est monomérique ou multimérique, a été également proposée (Ageorges et al., 2020).

B.2.2. L'adhésion des STEC

L'adhésion des STEC pourrait se produire au niveau de l'épithélium associé aux follicules des plaques de Peyer et des villosités de l'iléon terminal ou du côlon (Chong et al., 2007). Le pathotype STEC étant un vaste groupe de souches, plusieurs mécanismes d'adhésion semblent être utilisés. Le processus infectieux ainsi que la chronologie et le type d'adhésines exprimées par les STEC ne sont pas entièrement compris ni connus.

Toutefois, les isolats cliniques des STEC possèdent très souvent le gène *eae* qui code pour l'intimine. L'intimine forme des liaisons fortes avec les entérocytes en se liant à la protéine Tir. Cette interaction conduit à des lésions d'attachement/effacement (A/E), caractéristiques des STEC (**Figure 8**). Tir étant une protéine bactérienne codée par le LEE, la formation de ces lésions nécessite une connexion en amont des STEC au cytoplasme de la cellule hôte. Ainsi, le processus d'adhésion pourrait se généraliser en 2 étapes : (1) une adhésion primaire et (2) une adhésion étroite conduisant aux lésions A/E. Ce second type d'adhésion comprend : la translocation d'effecteurs bactériens (2a), l'association Intimine/Tir (2b) et le remodelage du cytosquelette d'actine et la formation d'un piédestal (2c) (**Figure 9**).

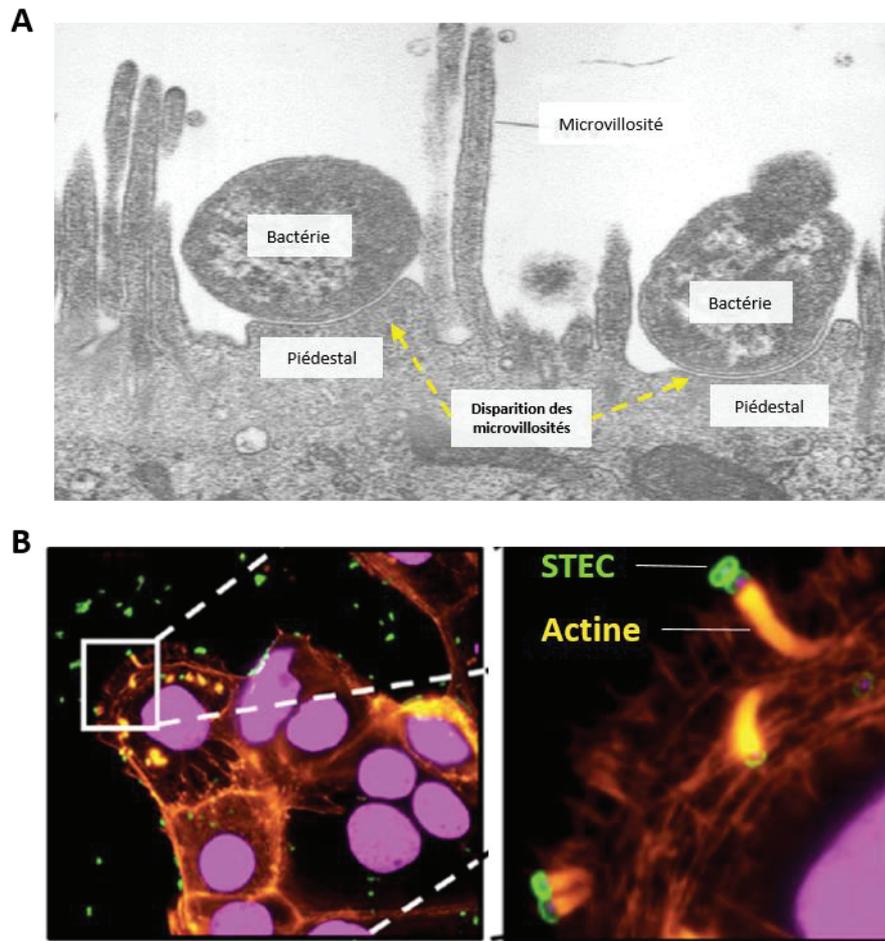


Figure 8. Lésions d'attachement/effacement (A/E) observées par microscopie électronique (**A**) et par microscopie à fluorescence (**B**). Les lésions A/E sont caractérisées par la formation d'un piédestal constitué d'actine cellulaire et la disparition des microvillosités (adaptée de Knutton et al., 1987 et Sanchez-Villamil et al., 2019, respectivement).

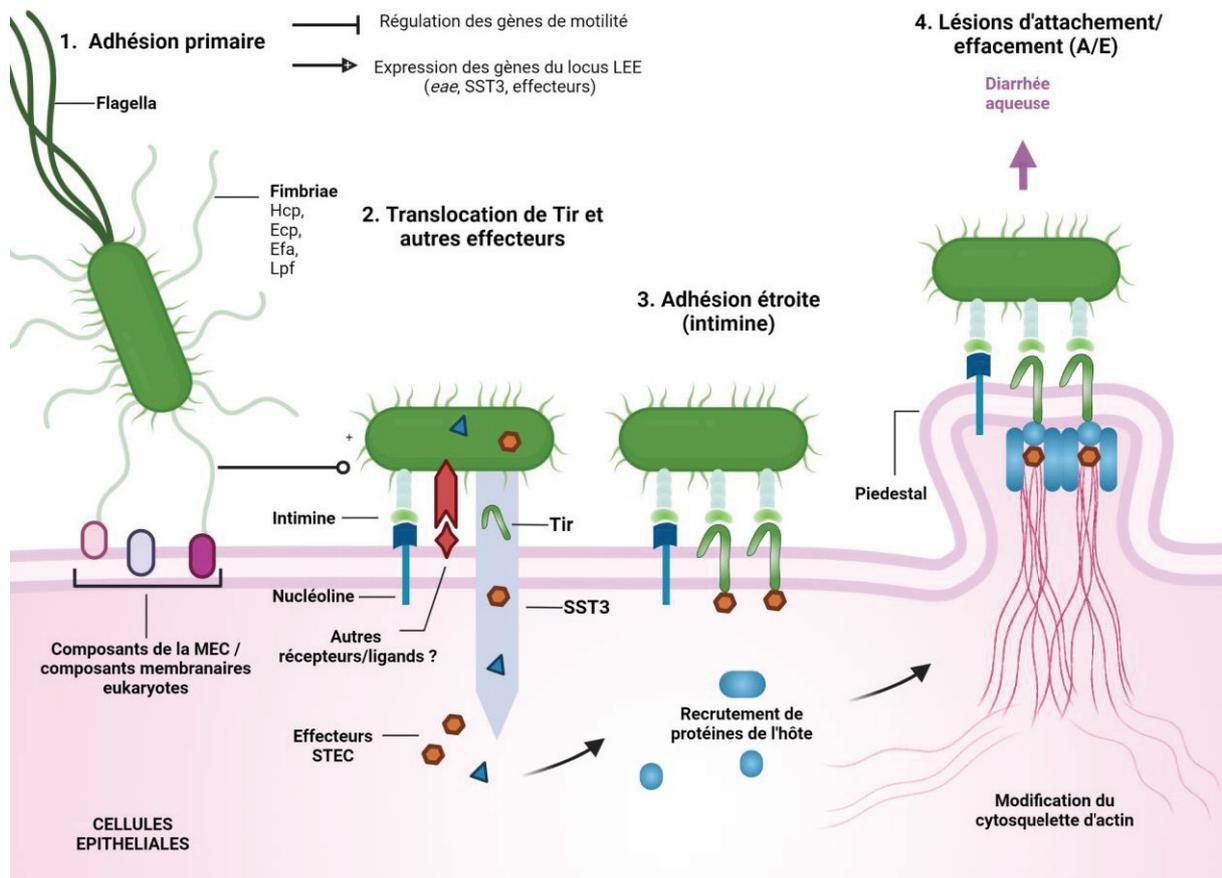


Figure 9. Schéma de l'adhésion des STEC aux cellules épithéliales intestinales et la formation des lésions d'attachement/effacement (A/E). Le processus d'adhésion des STEC aux cellules hôtes peut se généraliser en deux étapes : une adhésion primaire (étape 1) et une adhésion étroite conduisant aux lésions A/E (étape 3). L'adhésion étroite et spécifique des STEC engage les protéines Tir et l'intimine toutes deux codées par des gènes du LEE. Ce type d'adhésion nécessite une translocation en amont d'effecteurs bactériens dont Tir (étape 2) qui conduit aux lésions d'attachement/effacement (A/E) (étape 4). Le remodelage du cytosquelette d'actine et la formation du piedestal sont possible par l'action des effecteurs bactériens directement injectés dans le cytoplasme de la cellule hôte par le système de sécrétion de type 3.

B.2.2.1. Adhésion primaire des STEC

L'attachement des STEC aux entérocytes serait initié par des appendices extracellulaires longs (de type fimbriae) permettant une adhésion à distance (**Figure 7-B**). Plusieurs structures adhésives ont été décrites à la surface des STEC (**Tableau 3**). Parmi ces structures, les fimbriae Hcp, Ecp, Efa, Lpf pourraient être impliqués dans l'adhésion primaire des STEC aux entérocytes (Koutsoumanis et al., 2020). Le contact de ces adhésines avec la surface des cellules cibles déclencherait l'expression des gènes du locus LEE (*ae*, *tir*, gènes codant pour le système de sécrétion de type 3, molécules effectrices, etc.) (Feng et al., 2022). Aussi, il est supposé que l'intimine pourrait déjà être impliquée à cette étape en se liant avec la nucléoline (Melton-Celsa et al., 2012).

Tableau 3. Déterminants moléculaires impliqués dans l'adhésion cellulaire des STEC (adapté de Ageorges et al., 2020).

Facteur d'adhésion	Rôle
Protéines monomériques	
EhaB	Liaison à la laminine et au collagène I
EhaJ	Liaison à la fibronectine, fibrinogène, laminine, collagènes II, III et IV, formation de biofilm
EhaD/YpjA	Adhésion aux surfaces abiotiques, formation de biofilm
EhaC/YcgV/YfaL	Adhésion aux surfaces abiotiques, formation de biofilm
UpaB	Adhésion aux protéines ECM
UpaI	Adhésion aux protéines ECM, formation de biofilm, autoagrégation
Ag43	Autoagrégation, adhésion aux cellules épithéliales intestinales, formation de biofilm
AIDA-I	Autoagrégation, adhésion aux cellules épithéliales intestinales, formation de biofilm
EhaA	Autoagrégation, adhésion aux cellules épithéliales intestinales, formation de biofilm
UpaC	Autoagrégation, formation de biofilm
EspP	Adhésion aux cellules épithéliales intestinales, formation de biofilm
Pic/Shmu	Liaison à la mucine, colonisation intestinale, formation de biofilm
Intimin	Lésions A/E, colonisation intestinale
FdeC	Colonisation du rectum terminal des bovins, formation de biofilm
YeeJ	Formation de biofilms
latB	Formation de biofilms
latD	Formation de biofilms
OmpA	Adhésion aux cellules épithéliales intestinales et aux surfaces végétales
Hes	Autoagrégation, agglutination érythrocytaire, adhérence aux cellules épithéliales intestinales, formation de biofilm
Iha	Schéma d'adhésion diffus, colonisation intestinale
Dispersin	Colonisation intestinale
SsIE	Liaison et dégradation de la mucine, formation de biofilm, colonisation intestinale
Efa-1	Colonisation intestinale, adhérence aux cellules épithéliales
GAPDH	Liaison au plasminogène et au fibrinogène
EF-Tu	Agrégation bactérienne
Protéines multimériques	
UpaG/EhaG	Autoagrégation, adhésion aux cellules épithéliales intestinales, laminine, la fibronectine et les collagènes I à IV, formation de biofilm
Eib	Liaison à la fraction d'immunoglobuline de la fraction Fc d'IgA et d'IgG, CLA, autoagrégation, formation de biofilm
Sab	Adhésion diffuse aux cellules épithéliales intestinales, formation de biofilm aux surfaces abiotiques
Saa	Adhésion aux cellules épithéliales intestinales
Flagella	Motilité active, adhérence aux cellules épithéliales intestinales et feuilles végétales, formation de biofilm
Injectisome	Adhésion aux cellules de mammifères et de végétaux, formation de piédestal pendant les lésions A/E, formation de biofilm
T4P	Agrégation bactérienne, adhésion aux cellules épithéliales intestinales, fibronectine et laminine, formation de biofilm, motilité de contraction
CP	Conjugaison bactérienne, formation d'adhésion et de biofilm aux surfaces abiotiques
T1P	Adhésion aux surfaces abiotiques et aux cellules eucaryotes, formation de biofilm
AAF	Adhésion aux cellules épithéliales intestinales, à la fibronectine, à la laminine, au collagène IV, au DAF et au CAECAMS, formation de biofilm

Facteur d'adhésion	Rôle
F9	Adhésion aux cellules épithéliales intestinales et à la fibronectine
ELF	Adhésion aux cellules épithéliales intestinales et à la laminine
CS31A	Colonisation intestinale
LPF	Liaison à la fibronectine, la laminine, le collagène IV et plaques de Peyer, Formation de biofilm
ECP	Autoagregation, adhérence aux cellules épithéliales intestinales
SFP	Adhésion aux cellules épithéliales intestinales
Curli	Adhésion aux cellules épithéliales intestinales, aux cellules végétales et aux surfaces abiotiques, interactions cellule-cellule, formation de biofilm
Hcp	Agrégation bactérienne, formation de biofilm

B.2.2.2. Lésions d'attachement/effacement (A/E)

L'intimine se lie préférentiellement à la protéine Tir (*translocated intimine receptor*) qui est également codée par les STEC (locus LEE). La protéine Tir est transloquée dans le cytoplasme de la cellule hôte à l'aide d'un système de sécrétion de type III (SST3), puis insérée dans la membrane de la cellule hôte (**Figure 9**). L'intimine exerce ainsi une spécificité et une affinité très forte entre les STEC et la membrane des entérocytes. L'intimine peut également se lier, avec moins de spécificité et de force, à certains composants de la surface de la cellule hôte, tels que l'intégrine et la nucléoline (Frankel et al., 1996; Sinclair and O'Brien, 2002, 2004). Plus de 34 variants génétiques du gène *eae* ont été caractérisés et sont désignés par des lettres grecques et numérotés ($\beta 1$, $\beta 2$, γ , ϵ , ...) (Horcajo et al., 2012). Les données de prévalence sont insuffisantes pour évaluer l'association entre les variants du gène *eae* et la sévérité des infections à STEC (Koutsoumanis et al., 2020).

Simultanément à l'injection de la protéine Tir par le SST3, une série de protéines effectrices est injectée dans le cytoplasme de la cellule hôte (**Figure 9**). Ces effecteurs remplissent diverses fonctions comme l'hémolyse, la répression de la réponse lymphocytaire de l'hôte, l'inhibition de la phagocytose, l'invasion, la cytotoxicité et le transport du fer (Melton-Celsa et al., 2012). Ils activent aussi diverses voies de signalisation entraînant la destruction des microvillosités de l'épithélium intestinal, le remodelage du cytosquelette, la condensation de l'actine cellulaire et la formation d'un piédestal (**Figure 9**), permettant une adhésion étroite entre les STEC et la cellule. Cette caractéristique physiopathologique est appelée « lésions d'attachement/effacement (A/E) » et est spécifique des STEC et EPEC.

La formation de lésions d'attachement-effacement (A/E) entraîne la disparition des microvillosités (**Figure 8-A**) et par conséquent une diminution de la surface d'échange entre l'entérocyte et la lumière intestinale et un défaut de réabsorption de l'eau. Ces lésions et la réponse inflammatoire associée sont à l'origine des diarrhées aqueuses observées en premier lieu chez les patients (Gouali and Weill, 2013; Fila and Jones, 2022).

On peut également souligner que les STEC et les EPEC partagent des facteurs d'adhésion communs portés par le locus LEE, et par conséquent des lésions intestinales similaires sont observées (A/E) mais à des régions intestinales distinctes. Les EPEC colonisent préférentiellement le petit intestin alors que les STEC sont généralement retrouvés dans le colon (Croxen et al., 2013).

B.2.2.3. Autres stratégies adhésives des STEC

De plus, bien que les isolats de STEC porteurs du gène *eae* représentent la grande majorité des souches à l'origine d'infections humaines, certaines souches STEC dépourvues de gène *eae* ont été isolées chez des patients (Newton et al., 2009; Colello et al., 2019). Pour les STEC non-LEE (*eae* -), d'autres gènes, tels que ceux codés sur le mégaplasmide pO113 (gènes *saa*, *iha* et *sab*) peuvent fournir un mécanisme alternatif d'attachement des bactéries aux entérocytes (Newton et al., 2009). Certaines études suggèrent l'implication du long fimbriae polaire (Lpf) qui reconnaît des fragments de composants de la matrice extracellulaire eucaryote (ECM) (Farfan et al., 2011; Farfan and Torres, 2012).

Les études de caractérisation moléculaire des isolats de STEC ont également identifié *efa1*, *ompA*, *toxB* et *aggR* comme des gènes codant pour des facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion des STEC (Kaper et al., 2004; Herold et al., 2009; McWilliams and Torres, 2014). D'autres protéines peuvent interagir avec les immunoglobulines, par exemple la protéine de liaison aux immunoglobulines d'*E. coli* (Eib) (Lu et al., 2006; Rubin et al., 2017). La liste complète des facteurs de virulence, le moment de leur expression et les mécanismes impliqués dans la pathogénicité des STEC ne sont pas encore totalement connus.

B.3. Multiplication des STEC

Une fois fixées, les cellules STEC adhérentes se multiplient. De nombreux gènes impliqués dans le métabolisme et les processus cellulaires de cette étape ont été décrits (Gardette et al., 2019). Il est admis, qu'à ce stade de l'infection, les cellules STEC libèrent les Stx. Néanmoins, selon certains travaux, la libération des shiga toxines se produirait dès les premières étapes d'infection et induirait la localisation de la nucléoline à la surface des cellules servant d'ancrage pour les STEC (Robinson et al., 2006). Toutefois, la production de Stx à cette étape nécessite une régulation fine, car la libération des Stx peut entraîner la mort de la cellule productrice et par conséquent diminuer la quantité des cellules disponibles pour la colonisation du site d'infection. Des mécanismes de régulation encore méconnus sont probablement mis en jeu pour équilibrer la mort des cellules et la dissémination de la toxine et des nouveaux phages formés.

B.4. Libération des shiga toxines et conséquences

B.4.1. Généralités concernant les Stx

Les shiga toxines (Stx) sont des toxines de type AB₅ et font référence à la principale cytotoxine extracellulaire produite par *Shigella dysenteriae* appartenant au sérotype 1 (Karmali et al., 1983; O'Brien and LaVeck, 1983). La sous-unité A est le domaine actif de la toxine et la sous-unité B se lie avec le récepteur glycosphingolipide globotriaosylcéramide (Gb3) à la surface des cellules cibles (**Figure 10**).

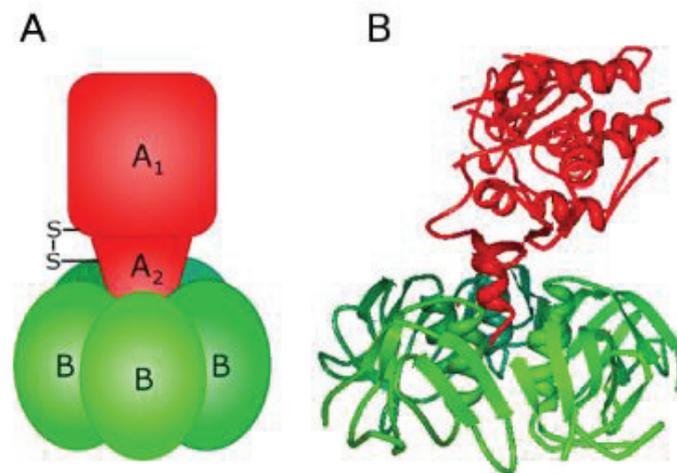


Figure 10. Modèles schématique (A) et structural déterminée par cristallographie aux rayons X des shiga toxines (B). Les shiga toxines sont des toxines de type AB₅. La sous-unité A, composée des chaînes A1 et A2 reliées par un pont disulfure, est le domaine actif de la toxine. Les sous-unités B forment un pentamère et se lient individuellement au récepteur glycosphingolipide globotriaosylcéramide (Gb3) à la surface des cellules cibles (adaptée de Kavaliauskiene et al., 2017).

Sur la base de leur toxicité *in vitro* et *in vivo* qui est différente, des séquences d'acides aminés ou des séquences nucléotidiques des gènes *stx*, les données scientifiques distinguent deux types de shiga toxines produites par les STEC: Stx1 et Stx2. Ces toxines sont codées respectivement par les gènes *stx1* et *sxt2* pour lesquels plusieurs variants ont été identifiés. La toxine Stx1 présente quatre sous-types différents (Stx1a, Stx1c, Stx1d et Stx1e) et la toxine Stx2 en a 12 (Stx2a, Stx2c, Stx2d, Stx2dact, Stx2e, Stx2f, Stx2g, Stx2h, Stx2i, Stx2j, Stx2k and Stx2l) (Henrique et al., 2022). Soulignons que de nouveaux variants sont régulièrement identifiés. Les variants alléliques des Stx semblent présenter des cytotoxicités différentes (Tarr et al., 2005).

Une souche STEC peut porter plusieurs gènes *stx* et sous-variants. Les études épidémiologiques ont montré que la Stx2, en particulier le variant Stx2a, est plus souvent associée à une maladie plus grave chez l'Homme que la Stx1 (Koutsoumanis et al., 2020). De plus, certains *Escherichia coli* produisent une Stx dont la cytotoxicité est activée par le mucus intestinal et l'élastase (Stx2d activable). Ces souches sont très virulentes chez la souris mais leur association avec les maladies humaines est mal comprise (Bielaszewska et al., 2006; Sánchez et al., 2017).

La particularité des gènes *stx* est qu'ils sont portés par prophages, des bactériophages qui se sont intégrés au chromosome bactérien lors d'une précédente infection. Certains de ces virus, spécifiques aux bactéries, peuvent rester en dormance au sein du génome. Sous certaines conditions, comme en cas de carence nutritive ou de stress déclenchant la réponse SOS¹, le prophage peut sortir de son état de dormance, activer son cycle lytique et entraîner l'expression de ces gènes. L'ADN prophagique apporte ainsi de nouvelles fonctions à la bactérie, comme les toxines Stx 1/2, dans le cas des STEC.

B.4.2. Mode d'action des Stx

B.4.2.1. Sécrétion des Stx

Les sous-unités A et B des Stx sont sécrétées dans le périplasme de la bactérie puis assemblées pour former la toxine. Contrairement à d'autres toxines, la shiga toxine n'est pas sécrétée par un mécanisme spécifique. L'accumulation de toxines dans le périplasme de la bactérie conduit à la lyse bactérienne et à la libération des Stx dans l'intestin. Les nouveaux phages formés lors du cycle lytique par les cellules STEC infectées sont également libérés et peuvent infecter les bactéries intestinales commensales, entraînant une nouvelle production de toxine et augmentant la gravité des symptômes (Chan and Ng, 2016).

B.4.2.2. Translocation des shiga toxines à travers l'épithélium intestinal

Il est admis que les shiga toxines atteignent les cellules endothéliales du système nerveux central (SNC) et des reins principalement, mais aussi du pancréas, du foie, et du cœur et des cellules hématopoïétiques (Brigotti et al., 2011) via la circulation systémique. En effet,

¹ Système de survie des bactéries, régulant la réparation de l'ADN bactérien et à la reprise de la réplication, en réponse à des lésions importantes de leur ADN. Ce mécanisme est régulé par le répresseur LexA et l'activateur RecA.

les récepteurs des Stx sont retrouvés à la surface d'une variété de cellules humaines mais semblent être absents de la muqueuse colique (Schüller et al., 2004), bien que des travaux aient montré la présence du récepteur Gb3 et Gb4 en faibles quantités (Zumbrun et al., 2010). Les mécanismes empruntés par les Stx libres pour rejoindre la circulation systémique ne sont pas entièrement compris et plusieurs hypothèses ont été proposées (entre autres, la transcytose indépendante ou dépendante du récepteur Gb3 et le transport paracellulaire pendant la transmigration des neutrophiles) (Schüller, 2011).

Il a également été montré que certaines souches STEC sont capables de transloquer à travers les cellules M pour traverser la barrière épithéliale. Après avoir été capturées par les macrophages résidents, les Stx produites par les STEC induisent l'apoptose des macrophages infectés sous-jacents et la libération des toxines et de cellules STEC dans la lamina propria intestinale (Etienne-Mesmin et al., 2011). En complément de cette libération après la lyse bactérienne, il a été montré que ces toxines pouvaient aussi être libérées dans des vésicules membranaires extracellulaires (Kolling and Matthews, 1999) capables d'être internalisées par les cellules épithéliales de l'intestin (Bielaszewska et al., 2017). Les mécanismes de sécrétion et d'internalisation des Stx jouent un rôle fondamental dans la pathogénie des infections à STEC et les dommages de l'organisme humain.

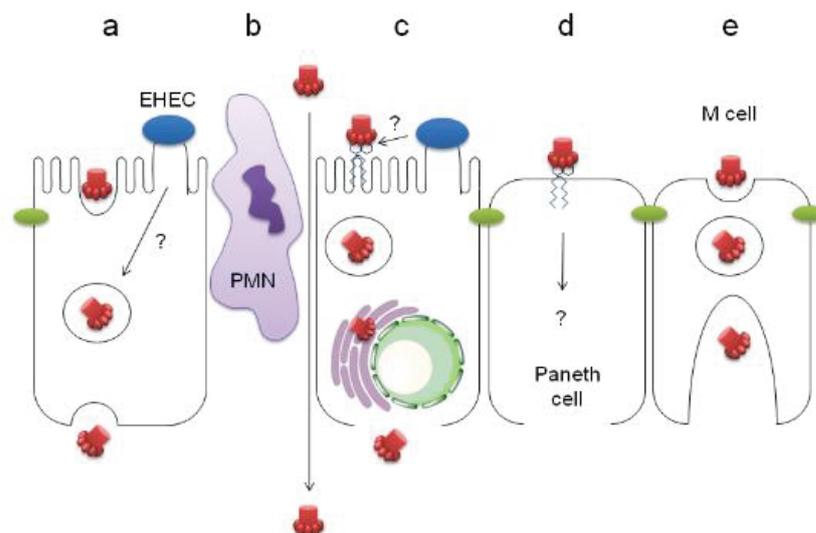


Figure 11. Voies potentielles de translocation de la shiga toxine à travers l'épithélium intestinal humain. Transcytose indépendante de Gb3 (a), transport paracellulaire pendant la transmigration des neutrophiles (PMN) (b), induction de l'expression de Gb3 par une infection par EHEC/STEC, transport rétrograde et libération de Stx après la mort cellulaire (c), translocation dépendante de Gb3 par les cellules de Paneth (d) et transcytose par les cellules M (e) (d'après Schüller, 2011).

B.4.2.3. Internalisation des shiga toxines par les cellules eucaryotes

Pour induire une toxicité, les Stx pénètrent dans les cellules eucaryotes grâce à la sous-unité B qui présente une forte affinité pour le récepteur globotriaosylcéramide (Gb3) et dans une moindre mesure, pour le globotétraosylcéramide (Gb4) (Legros et al., 2018). L'affinité de la sous-unité B avec ces récepteurs membranaires permet l'entrée de la toxine dans le cytoplasme de la cellule par endocytose (**Figure 12**).

Après son internalisation, la sous-unité A subit un transport rétrograde vers le réticulum endoplasmique où elle est clivée en deux fragments (A1 et A2). Puis seule la chaîne A1 est transloquée dans le cytosol (Garred et al., 1997).

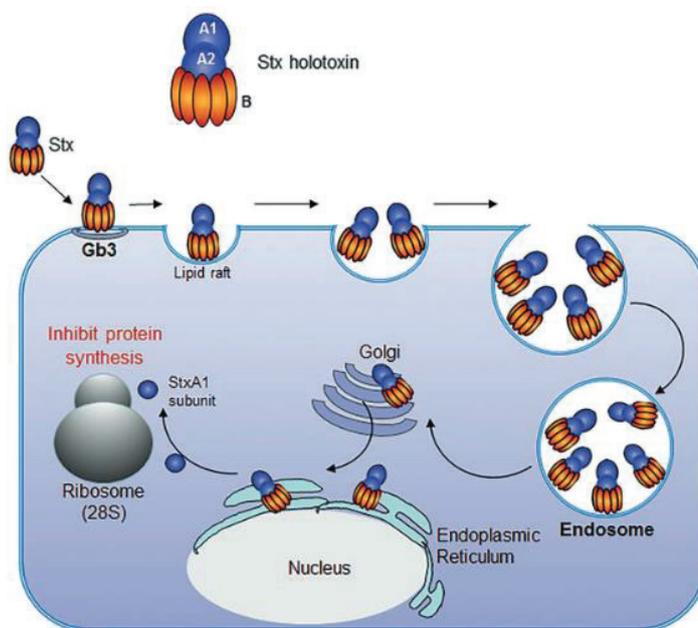


Figure 12. Pathogénèse des shiga toxines. Les Stx pénètrent dans les cellules eucaryotes grâce à la sous-unité B qui reconnaît le récepteur globotriaosylcéramide (Gb3). Après son internalisation, la Stx est clivée au niveau du réticulum endoplasmique, libérant la chaîne A1 dans le cytosol. La sous-unité A1 inhibe la traduction en induisant la mort de la cellule (d'après Bhunia, 2018).

B.4.2.4. Action cytotoxique des Stx

Une fois dans le cytosol, la toxine peut exercer son activité N-glycosidase et cliver l'ARN ribosomal 28S conduisant à l'inhibition de la traduction. La shiga toxine entraîne ainsi plusieurs réponses cellulaires et dans la plupart des cas, la finalité est l'apoptose. Le déclenchement des signaux apoptotiques par les cellules atteintes est de diverses origines : le stress ribotoxique, l'accumulation de protéines non repliées dans le RE et l'expression de certaines cytokines (Foster and Tesh, 2002; Cherla et al., 2006; Lee et al., 2021).

La mort de ces cellules déclenche une réaction inflammatoire locale et participe, avec l'action des Stx, à la formation de lésions associées aux microangiopathies thrombotiques (MAT), typiquement observées lors d'un SHU (Fila and Jones, 2022). La MAT est un ensemble de maladies au cours desquelles les petits vaisseaux sanguins de l'organisme sont obstrués par des petits bouchons de plaquettes, ce qui atteint à terme différents organes (AP-HP, 2020)

Les lésions de MAT au niveau du système vasculaire intestinal contribuent à la présence de sang dans les selles du patient, caractéristique d'une infection à STEC (Schüller, 2011). Les mécanismes physiopathologiques causant les diarrhées hémorragiques ne sont pas entièrement connus. La libération des Stx et la réponse immunitaire déclenchées par les STEC entraîneraient l'érosion de la muqueuse colique et la destruction de ces capillaires sanguins. Plus grave, les lésions de MAT au niveau des reins et du cerveau sont responsables à terme de l'apparition de SHU et de purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) plus rarement.

C. Manifestations cliniques d'une infection à STEC

Les symptômes d'une infection à STEC sont variés. On peut observer chez les malades une diarrhée légère non compliquée à une diarrhée sanglante sévère et dans des cas graves des complications comme un syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT).

Les premiers symptômes apparaissent généralement entre 2 à 12 jours après la l'ingestion de la bactérie (ANSES, 2019). Les principaux symptômes sont la diarrhée et une évolution vers une colite hémorragique qui inclut crampes abdominales et diarrhée sanglante. Des nausées et des vomissements sont parfois signalés.

La colite hémorragique survient dans 60 % des cas diagnostiqués positifs aux STEC et est généralement observée chez des patients présentant très peu de fièvre (Bruyand et al., 2018; ANSES, 2019). Bien que ces symptômes s'améliorent généralement en une semaine, 10 à 15 % des cas d'infection à STEC développent un SHU (Bruyand et al., 2018).

Un SHU est diagnostiqué par les signes cliniques suivants : une insuffisance rénale aiguë, une diminution des globules rouges (anémie hémolytique) et du nombre de plaquettes sanguines (thrombocytopénie). La létalité du SHU chez l'enfant âgé de moins de 15 ans est de 1 % en France (Bruyand et al., 2019). Le développement d'un SHU induit une insuffisance rénale chronique pour plus de 50 % des survivants et des complications neurologiques graves dans 10 à 20 % des cas (Fila and Jones, 2022). L'infection à STEC est la cause la plus

fréquente d'insuffisance rénale aigüe chez les enfants de moins de 5 ans (Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2012).

L'association des études épidémiologiques et le séquençage (WGS) systématique des souches STEC isolées de patients ont mis en avant des facteurs propres aux souches impliquées dans la survenue de l'infection ainsi que la sévérité des symptômes. Par exemple, les infections à STEC possédant les variants *stx2a* et *stx2d* sont pour la majorité associés à des formes graves d'infection (Jones et al., 2020). Par ailleurs, les souches appartenant aux sérotypes du Top-5 sont majoritairement incriminées dans les cas de coliques hémorragiques et/ou de SHU (cf. partie **A.2 ci-dessus**).

La surveillance rapprochée des cas de SHU met en lumière que les enfants de moins de 3 ans sont principalement touchés par ces complications (Bruyand et al., 2019). Les facteurs de risque de développer un SHU ne sont pas clairs, mais la composition du microbiote pourrait être un élément de réponse (Martins et al., 2022). Aussi, une étude menée sur une souche STEC O157:H7 montre une sensibilité moindre aux conditions gastriques de l'enfant que de l'adulte (Roussel et al., 2016). Cette même étude montre que les niveaux d'expression des gènes *stx* et des gènes d'adhésion *eae* et *lpf* sont plus importants chez l'enfant que chez l'adulte. Il a également été rapporté que l'immaturation du système immunitaire et une quantité plus importante de récepteur Stx à la surface des cellules rénales d'enfants contribuent à la susceptibilité des nouveau-nés au SHU (Chaisri et al., 2001).

Les études précédemment discutées ont pour principal modèle des souches STEC O157. Les souches non-O157, en particulier les souches O26, O103 et O80 sont davantage responsables d'infections et de développement de SHU en France de nos jours (Jones et al., 2020). Ces souches présentent peut-être des mécanismes différents de pathogénie. De plus, l'absence d'un modèle *in vivo* proche de la physiopathologie humaine des infections à STEC ajoute une difficulté supplémentaire à la compréhension du processus infectieux dans son ensemble, y compris l'implication des facteurs liés à l'hôte.

D. Stratégies thérapeutiques des infections à STEC

Les stratégies anti-infectieuses contre les STEC sont limitées de par l'influence de certaines classes d'antibiotiques sur l'expression des shiga toxines et sur la modulation de la perméabilité membranaire bactérienne pouvant favoriser la libération des toxines dans le milieu extracellulaire. Outre les diarrhées qui se résolvent naturellement au bout de quelques jours, le principal enjeu est de limiter la dissémination et l'action des Stx pour prévenir le développement de SHU.

Le traitement actuel d'une infection à STEC reste essentiellement symptomatique, en particulier des dialyses et des transfusions sanguines. Les patients doivent généralement être hospitalisés dans des services spécialisés dans la prise en charge de SHU. Une prise en charge multidisciplinaire est souvent nécessaire en phase aiguë, impliquant des néphrologues, des médecins de soins intensifs, des chirurgiens, des neurologues et des cardiologues (Jones et al., 2020). En phase aiguë, environ 60 % des patients ont besoin d'une dialyse et 80 % d'une transfusion de globules rouges (Bruyand et al., 2018).

L'utilisation d'antibiotiques dans le cadre d'une infection à STEC est controversée car soupçonnée d'être associée à un risque plus élevé de SHU. Cependant, seuls les antibiotiques bactéricides seraient liés à un risque plus élevé de SHU (Smith et al., 2012), car ils entraîneraient la lyse cellulaire et par conséquent la libération des toxines dans l'organisme. De plus, certains travaux réalisés avec de nombreuses souches ont démontré une grande variabilité de réponses selon le sérotype et le type de shiga toxine produite (Pedersen et al., 2008). Bien que les résultats des études semblent contradictoires, deux classes d'antibiotiques se distinguent : (1) les fluoroquinolones (en particulier la ciprofloxacine) induisent une production accrue de Stx par les isolats de STEC et (2) les macrolides et en particulier l'azithromycine apparaissent le plus souvent sans effet ou avec un effet inhibiteur du développement bactérien (Agger et al., 2015).

À ce jour, les données scientifiques ne suffisent pas à interdire ou à recommander un traitement par l'azithromycine pour les patients déclarant une infection à STEC (Haut Conseil de la santé publique, 2015; CNR des microangiopathies thrombotiques, 2021). Les infections à STEC liées au sérotype O80 posent un dilemme thérapeutique, car ces souches peuvent entraîner une septicémie, qui nécessite une antibiothérapie (Soysal et al., 2016).

Dans le cas de formes sévères de SHU avec atteinte extra-rénale, la société française de pédiatrie recommande l'utilisation de l'Eculizumab (SOLIRIS®), un anticorps monoclonal inhibiteur de la fraction C5 du complément. La shiga toxine peut activer le système du complément, un mécanisme de l'immunité innée, qui conduit à la lyse des cellules (Orth et al., 2009). Cet anticorps bloque ainsi le processus inflammatoire et freine l'évolution de la maladie (Walsh and Johnson, 2019).

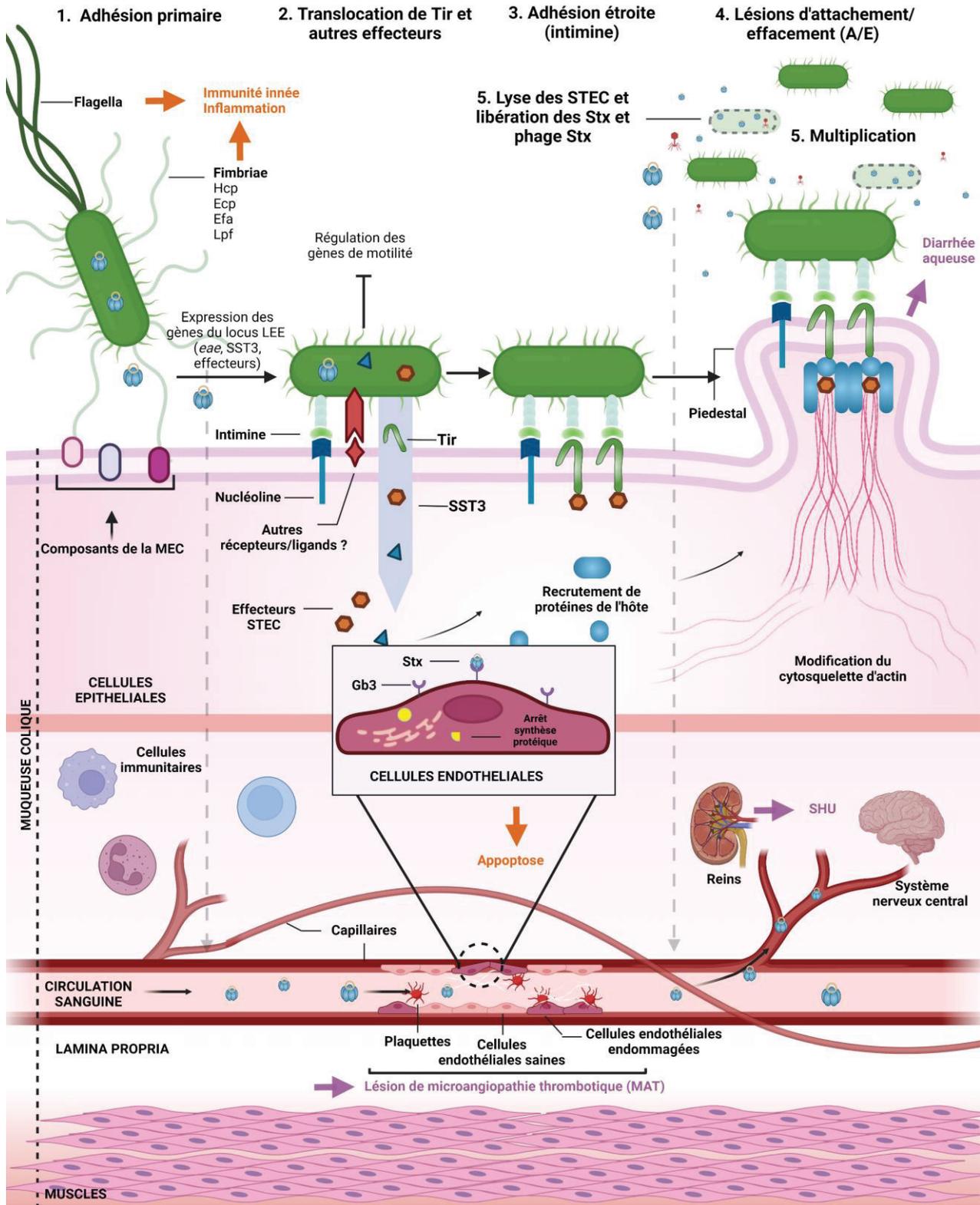


Figure 13. Schéma clé. Les grandes lignes de la pathogénie et de la physiopathologie des infections à STEC sont globalement connues mais des lacunes restent à être comblées, comme l'identification des adhésines impliquées avant l'interaction du couple Intimine/Tir, leur chronologie d'expression et leur régulation. Les mécanismes de diffusion des Stx dans la circulation systémique sont aussi encore mal compris. Le génome des STEC abrite également d'autres de facteurs de virulence, comme l'hémolysine HlyA, la protéase EspP et la catalase KatP, mais leur rôle dans la pathogénie des STEC n'est pas démontré (Brugère et al., 2012; Gouali and Weill, 2013). Nous retiendrons aussi la L-asparaginase II qui inhibe la prolifération des lymphocytes T, la cytotoxine subtilase (SubAB) ou encore le facteur d'élongation thermo-instable (EF-Tu) dont le rôle n'est pas connu (Torres et al., 2020; Tsutsuki et al., 2022).

Chapitre 3

**Lait cru et globules gras :
spécificités liées à la
membrane biologique**

Ce troisième chapitre apporte des notions complémentaires à la revue de la littérature présentée en Chapitre 1, sur les produits laitiers et les globules gras du lait cru.
Le lait cru, sa transformation et ces composants sont présentés.

A. Le lait cru

A.1. Définition

Le Codex Alimentarius définit le « lait » comme « la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur » (Codex Alimentarius, 1999). Concernant le « lait cru », sa définition est harmonisée en 2004 par le Codex Alimentarius, tel qu' « un lait qui n'a pas subi de traitement thermique à plus de 40 °C ou tout autre traitement ayant un effet équivalent » (Codex Alimentarius, 2004). La température du lait cru avoisine 37 °C – la température corporelle de l'animale – juste après la traite. Le lait cru est donc un lait qui n'a eu aucun traitement autre que la réfrigération immédiate après la traite à la ferme à 4 °C. La date limite de consommation (DLC) du lait cru est très courte (72 h après la traite si conservée au frais), ce qui en fait un produit peu commercialisé par les enseignes de la grande distribution et par conséquent peu consommé.

Le terme « lait », sans qualificatif, désigne généralement le lait de vache, celui-ci étant majoritairement consommé. Pour autant, le lait d'autres espèces animales comme celui de chèvre ou de brebis est couramment consommé en France (CNIEL, 2021). Dans d'autres zones géographiques, du lait de jument, d'ânesse, de lamate, de chamelle, de dromadaire, de bufflonne, de renne, de zébu ou encore de yack sont culturellement consommés.

A.2. Description du lait

Le lait cru est un liquide opaque et blanc, tirant vers le jaune s'il est riche en matière grasse. C'est un milieu aqueux complexe, caractérisé par plusieurs phases en équilibre instable (**Figure 14**) : (1) une phase aqueuse (en bleu) dans laquelle sont dispersés les protéines solubles, le lactose et les minéraux, (2) une phase colloïdale majoritairement composée d'assemblages de protéines, les micelles de caséines (en gris) et (3) une phase grasse organisée sous forme de globules gras (en jaune). Le lait est donc à la fois une suspension de protéines et une émulsion (i.e., un mélange non-miscible de deux liquides).

Un litre de lait contient près de 900 g d'eau pour 130 g de matière sèche, largement représentée par des micelles de caséines (protéines insolubles) en suspension dans la phase aqueuse. Le lait, c'est aussi une émulsion naturelle de type « huile dans eau », dans laquelle la matière grasse est dispersée sous forme de milliards de gouttelettes lipidiques de l'ordre du micromètre dispersées dans la phase aqueuse du lait : les globules gras (**Figure 14**). Lorsque

le lait n'est pas régulièrement mélangé, les globules gras remontent à la surface du lait, par différence de densité avec l'eau, et forment une couche de crème.

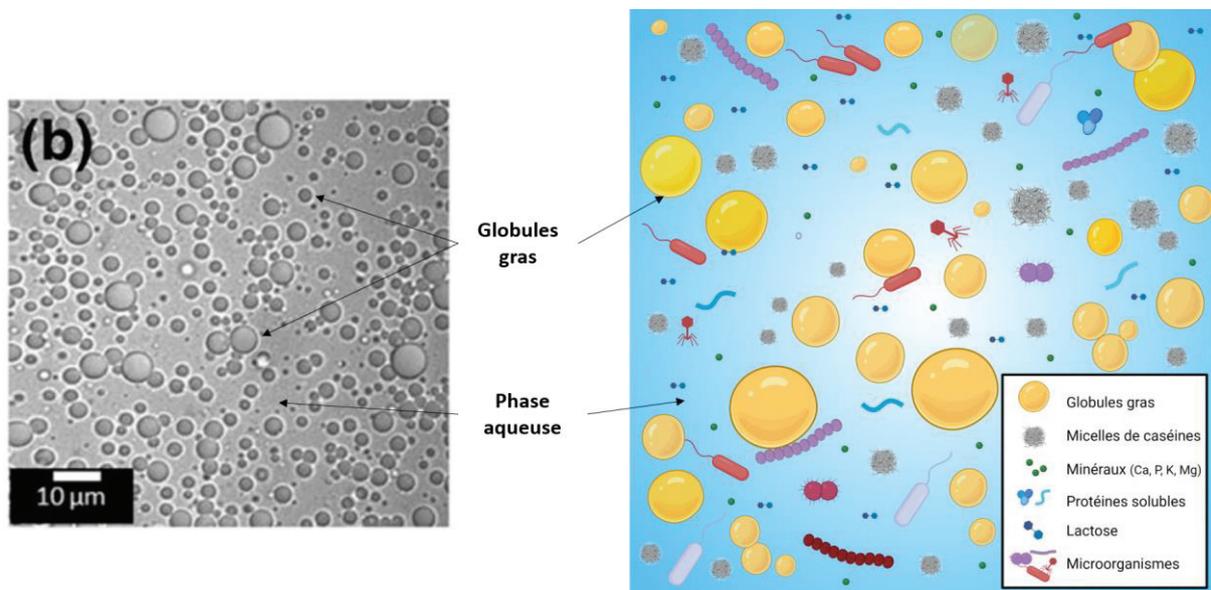


Figure 14. Observation du lait cru de vache au microscope (adapté de Lopez et al., 2015) et schéma des différents constituants du lait cru. Le lait est une émulsion de type « huile dans eau » où les globules gras, la matière grasse du lait et les caséines, les protéines majeures sont dispersées dans une phase aqueuse riche en minéraux et en lactose.

Le lait entier contient la plupart des éléments indispensables au bon fonctionnement de notre organisme : eau, protéines, vitamines, matières grasses, sels minéraux, lactose (International Dairy Federation, 2021). Avec un pouvoir calorifique compris entre 650 et 850 calories environ pour 1000 g de lait, selon le traitement qui a été appliqué (traité thermiquement ou cru), le lait de vache est un excellent aliment pour l'homme (Montjoux-Régis et al., 2011; Salamończyk, 2013).

Souvent décrit comme un « aliment vivant », le lait cru contient un microbiote d'une grande diversité. Le microbiote laitier est composé de divers microorganismes dont les plus prédominants sont *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* et des levures (Quigley et al., 2013; Tarrah et al., 2022). Certains de ces microorganismes sont dits bénéfiques grâce au rôle qu'ils jouent dans la santé du consommateur après leur ingestion (Kok and Hutkins, 2018). Le lait d'une mamelle saine étant stérile, les microorganismes le colonisent au moment de la traite. Les sources de contamination sont nombreuses et comprennent la surface des trayons et des machines, le personnel de l'exploitation, l'environnement (y compris la litière, l'air, l'eau et l'herbe), ainsi que les aliments et les récipients de collecte (O'Sullivan and Cotter, 2017). Outre les cellules procaryotes, le

lait contient aussi des cellules somatiques (un mélange de cellules lactifères et de cellules immunitaires), sécrétées au cours de la traite (Alhussien and Dang, 2018).

D'un point de vue physico-chimique, le lait est un produit très complexe où la phase grasse et la phase micellaire sont thermodynamiquement instables. L'environnement natif du lait, notamment un pH 6.7 (**Tableau 4**), présente les conditions physico-chimiques adaptées à l'équilibre de ces phases (Snappe et al., 2010). Les différents traitements qui peuvent être appliqués au lait cru visent à perturber l'équilibre de ces phases pour produire de nouveaux produits tels que du beurre, du fromage ou des crèmes glacées (Boutonnier, 2008).

Tableau 4. Caractéristiques physico-chimiques du lait (adapté de Boutonnier, 2008).

Paramètres	Valeurs
Masse volumique à 20 °C	1028 – 1034 kg/m ³
Point de congélation	-0,555 °C
pH	6,6 à 6,8
Acidité titrable	15 à 18 °D
Point d'ébullition	100,5 °C

A.3. Bref historique du lait cru

Le lait est avant tout un fluide biologique sécrété par toutes les femelles mammifères pour nourrir leur nouveau-né. La plupart des animaux juvéniles peuvent boire et digérer le lait de leur mère. Excepté les humains, il est assez rare que les mammifères consomment le lait d'autres espèces. Fromages, yaourts et autres produits issus de la transformation du lait font partie des aliments couramment consommés par les humains et surtout recommandés par les autorités (Cohen, 2017; Comerford et al., 2021). Depuis le début des civilisations, l'élevage et la consommation de lait d'autres espèces, en particulier de vache, est devenu une stratégie essentielle pour la survie.

Grâce à la découverte de biomarqueurs de la matière grasse laitière dans des récipients d'époque, l'analyse de l'âge d'abattage des mammifères et l'étude de peintures, les historiens estiment la consommation par les humains de lait et de produits dérivés, depuis le néolithique, l'ère de la domestication (Evershed et al., 2008). D'après les historiens, le lait était consommé tel quel ou transformé, notamment en fromage ou en produits laitiers fermentés. Fabriquer du fromage permettait non seulement de préserver le lait sous une forme plus facilement transportable, plus stable dans le temps, mais également d'en faire un produit plus digeste. En effet, la fermentation du lait cru facilite l'hydrolyse des protéines et du lactose en acide

lactique par les bactéries lactiques (Settanni and Moschetti, 2010; Sforza et al., 2012). En Europe, et en particulier en France, la consommation de lait se développe à partir du XVIII^e siècle (Delbaere, 2008).

D'antan, le lait était utilisé comme un alicament¹. Jusqu'au début du XX^e siècle, il était parfois prescrit sous forme d'injection sous-cutanée ou de lavement pour soigner la grippe, la fièvre typhoïde, le typhon, l'orchite, la salpingite, la blennorragie (« Le lait, la vache et le citadin » de Pierre-Olivier Fanig aux éditions Quæ, 2008). L'historien Pierre-Olivier Fanig raconte également dans son ouvrage, qu'à l'hôpital, un régime « lacté intégral » était administré aux malades, parfois jusqu'à 3 litres par jour. Le lait d'ânesse était parfois appliqué en cataplasmes ou en collyre pour les yeux malades. Le lait d'ânesse, considéré comme proche du lait maternel, se voit attribuer par les médecins des propriétés particulières : plus rafraichissant, plus réconfortant, plus rapidement digéré, il soigne les pathologies du poumon comme la toux, les maux d'estomac, la goutte, les rhumatismes. Paradoxalement, au XIX^e siècle, le lait était vecteur de nombreuses infections, notamment de la tuberculose, la diphtérie de la fièvre typhoïde, conduisant les politiques et les scientifiques de l'époque à conduire des recherches pour mieux préserver cet aliment nourrissant et protecteur pour l'organisme (Currier and Widness, 2018).

A.4. Traitement du lait de consommation

Les découvertes de l'assainissement du vin par la chaleur, menées par Louis Pasteur et Alfred de Vergnette de Lamotte au XIX^e (Pasteur, 1873; Galvez-Behar, 2018), ont été adaptées au lait cru quelques années plus tard, encouragées par le chimiste allemand Franz von Soxhlet (Boor et al., 2017). Depuis le milieu du XX^e siècle, la pasteurisation du lait cru est devenue pratiquement systématique afin d'augmenter sa durée de conservation et d'améliorer la sécurité sanitaire du produit destiné à la consommation humaine. Les méthodes d'élevage et l'amélioration des bonnes pratiques d'hygiène lors de la traite aujourd'hui limitent fortement le risque de contamination du lait cru par des bactéries pathogènes. De nos jours, le lait cru est de haute qualité, bien que le risque microbiologique persiste comme le démontrent les épidémies liées à la consommation de produits au lait cru et les résultats des analyses

¹ désigne un aliment qui contient des « composants classifiés ou non comme nutriments, reconnus capables d'influencer une grande diversité de fonctions impliquées dans l'état de bien-être et de santé ou la réduction du risque des maladies » Marcel B. Roberfroid, Véronique Coxam, Nathalie M. Delzenne, Aliments fonctionnels, Lavoisier, 2008, p. 55

d'autocontrôles réalisées par les producteurs et les industriels (Farrokh et al., 2013; Verraes et al., 2015).

Aujourd'hui, grâce au développement des techniques industrielles, différents traitements thermiques sont appliqués au lait cru pour éliminer les dangers microbiens potentiellement présents (thermisation, pasteurisation, stérilisation Ultra Haute Température - UHT) et de surcroît augmenter sa durée de conservation. Le lait UHT peut être conservé pendant 6 à 12 mois à température ambiante. En revanche, le lait pasteurisé doit être conservé au frais (4-7 °C) pour une durée de conservation d'environ 2 semaines (Machado et al., 2017). Le lait pasteurisé est très souvent utilisé pour la fabrication de fromages alors que le lait UHT est utilisé comme lait de consommation. Cependant, des bactéries, comme celles appartenant au genre *Bacillus*, sont capables de produire des endospores et survivre au processus de pasteurisation industrielle (Gopal et al., 2015). La plupart des pays appliquent donc une législation réglementant le traitement thermique du lait cru afin de garantir l'absence de microorganismes pathogènes.

Néanmoins, tous les traitements thermiques ont des conséquences sur la qualité et le potentiel nutritionnel d'un aliment même à des températures peu élevées. Bien que le traitement thermique vise en premier lieu à éliminer les microorganismes présents dans le lait, la chaleur peut altérer d'autres composants, notamment les protéines (Raikos, 2010), les composants glucidiques (Aalaei et al., 2019) et la structure de la matière grasse (Lopez, 2005).

Outre les traitements thermiques, la microfiltration peut être utilisée pour maîtriser certains microorganismes pathogènes tout en limitant l'impact du traitement sur les autres composants du produit. La microfiltration est une technique de conservation récente utilisant des membranes poreuses extrêmement fines (de 0,8 ou 1,4 µm) permettant de retenir les bactéries du lait (2 à 6 µm) (Lopez and Fauquant, 2016). En amont de la microfiltration, la matière grasse est séparée, stérilisée, puis rajouté à la phase aqueuse du lait microfiltré. Cette étape permet d'éviter que la matière grasse ne colmate les pores de la membrane filtrante. Un lait microfiltré conserve ainsi une partie des microorganismes naturels et doit être conservé au froid, comme un lait pasteurisé. Il se conserve 15 jours à température ambiante et 72 h après ouverture et stockage à basse température. Le lait microfiltré conserve ses propriétés gustatives et ses saveurs, se rapprochant de celles du lait cru. La microfiltration est également utilisée en technologie fromagère, pour retirer la flore naturelle et réensemencer avec une flore contrôlée (Montel et al., 2003).

Néanmoins, toutes ces méthodes nécessitent une homogénéisation préalable de la matière grasse pour la stabiliser physiquement. L'homogénéisation est un procédé

mécanique, qui consiste à faire passer le lait à haute pression (en général 100 à 200 bars dans l'industrie laitière) dans un petit trou pour casser les globules gras et diminuer leur diamètre autour de 0,6 – 0,8 µm en moyenne contre 4.6 µm initialement (Lynch et al., 2006). Dans ces conditions, la phase grasse du lait est dite « stabilisée » et ce procédé permet de limiter la remontée de la crème à la surface.

B. Les produits laitiers et habitudes de consommation

B.1. Du lait cru aux produits laitiers

Les produits laitiers proviennent tous d'une seule et même matière primaire : le lait cru. Comme stipulé précédemment, le lait, et en particulier celui de vache, est consommé régulièrement par l'homme sous diverses formes. Les produits laitiers sont regroupés en 3 catégories : les laits (cru, standardisé, pasteurisé, stérilisé, UHT, en poudre, demi-écrémé, entier, écrémé, fermenté), les fromages, les laits fermentés ainsi que les fromages blancs. La crème fraîche, les glaces, les crèmes et le beurre ne sont pas systématiquement classés comme des produits laitiers mais plutôt comme des corps gras, car souvent riches en matière grasse et sucres, et pauvres en calcium et en protéines. De par sa grande richesse en eau, le lait est parfois classé dans la catégorie des boissons.

L'industrie laitière applique ainsi différents traitements au lait cru pour obtenir les produits qui composent la grande famille des produits laitiers. La transformation du lait fait intervenir uniquement des processus physiques et/ou biochimiques. Parmi les traitements principaux, on retrouve : (i) l'écémage et le crémage qui consistent à séparer la crème du lait pour la production de beurre ou de crème de consommation ou pour standardiser la concentration en matière grasse dans le produit fini, (ii) la fermentation du lait grâce aux réactions biochimiques naturelles des bactéries et de leurs enzymes, comme la fermentation lactique ou propionique utilisée pour la fabrication de fromages, ou encore (iii) la coagulation par l'ajout de présure ou autres enzymes coagulantes qui permet la transformation du lait en caillé, des fromages et de certains desserts lactés (Soustre et al., 2017).

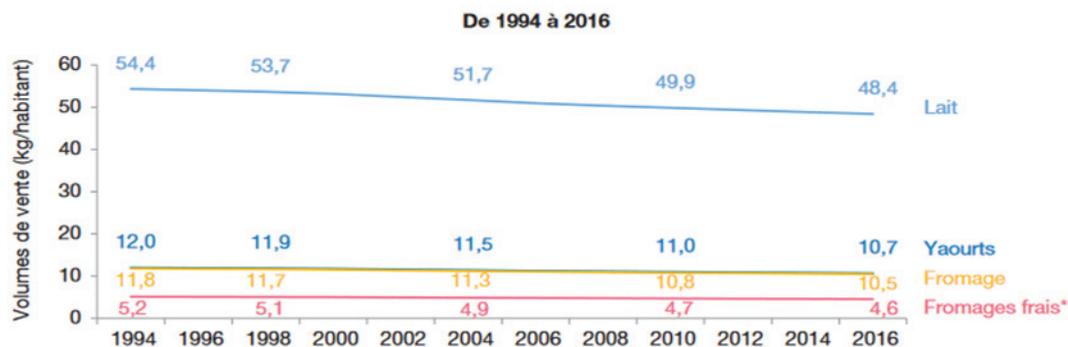
Pour chaque catégorie de produits laitiers, on distingue des sous-catégories selon le ou les types de traitements thermiques qui ont été appliqués au lait (cru, pasteurisé, UHT, etc) et l'espèce de l'animal s'il ne provient pas de la vache (chèvre, brebis, etc). La réglementation prévoit pour les laits de consommation deux critères obligatoires sur l'étiquette : l'espèce de l'animal s'il ne provient pas de la vache, le taux de matière grasse et le procédé utilisé pour allonger sa durée de conservation (Légifrance, 2007). En France, il n'est pas obligatoire d'indiquer que le lait a été homogénéisé.

B.2. Consommation des produits laitiers

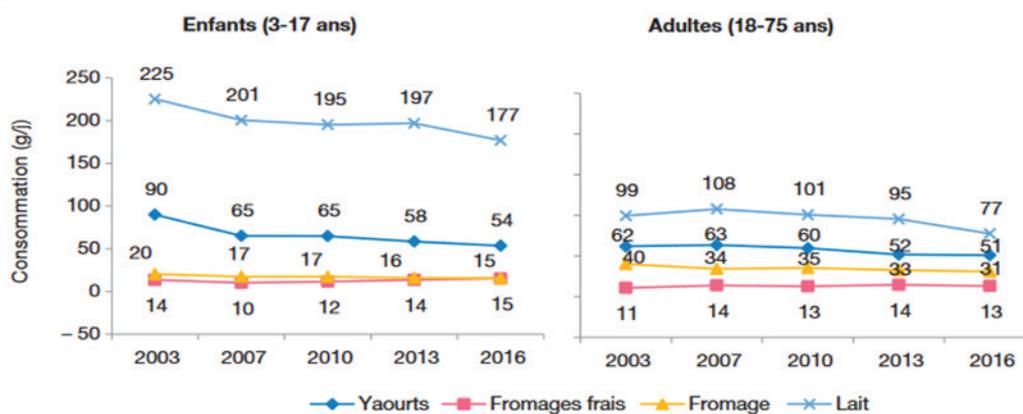
Chaque Français achète en moyenne 36 litres de lait, 25 kg de produits laitiers ultra-frais (yaourts, fromages blancs), 4 kg de crèmes, 13 kg de fromages et 2,5 kg de beurre par an (CNIEL, 2021). En volume, les laits de consommation conditionnés sont les produits les plus achetés mais en valeur ce sont les fromages. Ils représentent environ 7,8 milliards d'euros de marchandise contre 1,9 milliard pour les laits conditionnés (FranceAgriMer, 2020). Les industries agroalimentaires françaises présentaient un chiffre d'affaires de près de 40 milliards d'euros en 2018 (CNIEL, 2021). Ces chiffres restent élevés mais les ventes des produits laitiers tendent à diminuer (**Figure 15-A**). Plus précisément, depuis 1994, la consommation de lait liquide et de yaourt diminue auprès des enfants et des adultes, alors que la consommation de fromages tend à se stabiliser (**Figure 15-B**). Aussi, les types des produits laitiers consommés au cours de la vie varient avec l'âge. Le lait est davantage consommé par les enfants alors que la consommation de fromages augmente avec l'âge (**Figure 15-C**).

En ce qui concerne le lait cru, les habitudes de consommation et les ventes sont mal connues, contrairement aux fromages au lait cru (Bagel and Sergentet, 2022). En effet, le lait cru étant peu commercialisé par les circuits de la grande distribution, mais plutôt via des circuits courts du producteur directement ou en vente dans une coopérative, peu de chiffres sont disponibles. Toutefois, une étude réalisée en 2013 rapporte qu'environ 3,4 % des Américains consommeraient du lait cru (Buzby et al., 2013). Un rapport mené par l'Agence britannique des normes alimentaires, *Food Standards Agency*, souligne un regain d'attrait des consommateurs pour le cru, avec près de 10 % de consommateurs contre 3 %, en 2012 (FSA and ACSS, 2018).

A



B



C

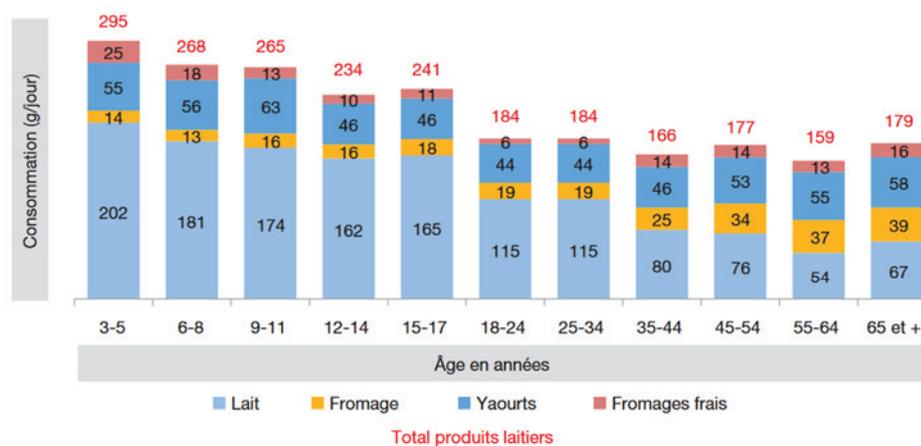


Figure 15. Consommation des produits laitiers en France. Vente (kg/an/habitant) des produits laitiers entre 1994 et 2016 (A). Consommation (g/j) des produits laitiers entre 2003 et 2016 (B). Consommation moyenne de produit laitiers (g/j) par jour en fonction de l'âge (C) (adaptée de Charby et al., 2017).

C. Composition du lait cru

C.1. La phase aqueuse du lait cru

L'eau est le constituant le plus important du lait (900 - 910 g.L⁻¹) dans lequel sont dispersés tous les autres constituants (protéines, sucres, minéraux, lipides) (**Tableau 5**). Cette phase est stable et contient la majorité des sucres, des sels minéraux et des protéines solubles. Les glucides du lait sont majoritairement représentés par le lactose (49 g.L⁻¹). Le lactose joue un rôle nutritionnel particulier et intervient également comme sources de fermentation pour les bactéries lactiques, abaissant le pH et induisant la coagulation du lait (Adam et al., 2005). D'autres oligosaccharides ont été identifiés dans le lait cru mais en faibles quantités. Il s'agit du glucose et du galactose qui proviendraient de l'hydrolyse du lactose. De plus, certains glucides sont retrouvés combinés à des protéines et des lipides, formant ainsi des glycoconjugués (Gopal and Gill, 2000).

La phase aqueuse du lait est une source importante de minéraux qui varient de 8,5 à 9 g.L⁻¹ (**Tableau 5**). Parmi eux, le calcium est très souvent mis en avant lors de la promotion de la consommation de produits laitiers. Il s'agit de l'un des constituants des os et des dents et joue un rôle important dans la contraction musculaire, la transmission de l'influx nerveux et la coagulation sanguine (Katiyar, 2022). Le lait contient également du potassium, du phosphate, du magnésium et du sodium. D'autres éléments sont également présents à de plus faibles concentrations ou à l'état de traces dans le lait : soufre, fer, cuivre, zinc, iode, manganèse, bore, fluor, silicium (Guo and Hendricks, 2008). Les minéraux du lait se trouvent également sous forme micellaire insoluble. Cet équilibre minéral entre la phase colloïdale et la phase soluble dépend à la fois du pH, de la force ionique et de la température du lait (Le Graet and Brulé, 1993).

Les protéines sériques (solubles) représentent environ 17 à 18 % de la matière azotée totale du lait (**Tableau 5**). De plus, 5 à 6 % de la matière azotée est présente sous forme non protéique (urée, créatine, acides aminés). La β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine représentent les protéines solubles majeures de la phase aqueuse et les protéines mineures regroupent les immunoglobulines (environ 13 %), la sérum albumine bovine (environ 7 %) et la lactoferrine (environ 4 %). Ces protéines présentent des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles pour l'homme très intéressantes (Vargas-Bello-Pérez et al., 2019). Divers enzymes comme des protéases, phosphatases, lipases et lysozymes sont aussi retrouvées dans le lait ainsi que des vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) (**Tableau 5**).

Tableau 5. Composition d'un litre de lait de vache (adapté de Guo and Hendricks, 2008; Snappe et al., 2010).

Eau	900 à 910 g		
Extrait sec dont :	125 à 135 g		
MATIERE GRASSE	35 à 45 g		
LACTOSE	47 à 52 g		
MATIERES AZOTEES composé de :	30 à 36 g	100 %	
Caséines :	24 à 28 g	77 à 78 %	100 %
Caséine α_{s1}	9 à 11 g		36%
Caséine β	9 à 11 g		34%
Caséine κ	3 à 4 g		13 %
Caséine α_{s2}	3 à 4 g		10 %
Caséine γ 1, 2, 3	1 à 2g		7 %
Protéines sériques :	5 à 7 g	17 à 18 %	100 %
β -Lactoglobuline	2 à 4 g		50 %
α -Lactalbumine	1 à 1,5 g		22 %
Sérum albumine bovine	0,1 à 0,4 g		5 %
Immunoglobulines	0,6 à 1,0 g		12 %
Protéase peptones	0,6 à 1,8 g		10 %
Azote non protéique :			
Créatine, Urée, Acides aminés	1,5 g	5 à 6 %	
MINERAUX	8,5 à 9 g		
Calcium	1,2 à 1,25 g		
Potassium	1,34 g		
Clore	1,04 g		
Phosphate	0,95 g		
Sodium	0,42 g à 0,58 g		
Magnésium	0,98 g		

C.2. La phase colloïdale du lait cru

La phase colloïdale est une suspension de particules dispersées dans la phase aqueuse. Ces particules sont des micelles phosphocalciques ou micelles de caséines. Les caséines représentent 70 à 78 % de la matière azotée du lait (**Tableau 5**). Ce sont des protéines insolubles liées au phosphore et au calcium. Les caséines sont classées en quatre isoformes principales, les caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ , dont la moitié est présente sous la forme α (Holt, 1992). Les micelles de caséines sont chargées négativement dans le lait cru, -20 mV à pH 6.7 (Bijl et al., 2019). Il en résulte des répulsions électrostatiques entre micelles assurant leur stabilité et évitant leur agglomération. Les micelles de caséines peuvent être déstabilisées

sous l'action de facteurs extérieurs (acidification, alcool, sels) qui neutralisent les charges négatives (Snappe et al., 2010). Il s'ensuit alors l'agglutination des micelles de caséines : c'est la coagulation du lait.

C.3. La phase grasse du lait cru

C.3.1. Les globules gras du lait cru

La matière grasse du lait cru est présente sous forme de microgouttelettes de triglycérides (TAG) entourées d'une membrane biologique complexe (**Figure 16**). Ces microgouttelettes sont appelées « globules gras » (GG) ou « *milk fat globules* » (MFG) en anglais. La membrane qui les entoure, appelée la membrane des globules gras du lait (« *milk fat globule membrane* »; MFGM), assure l'intégrité et l'individualité des globules gras (Lopez and Ménard, 2011).

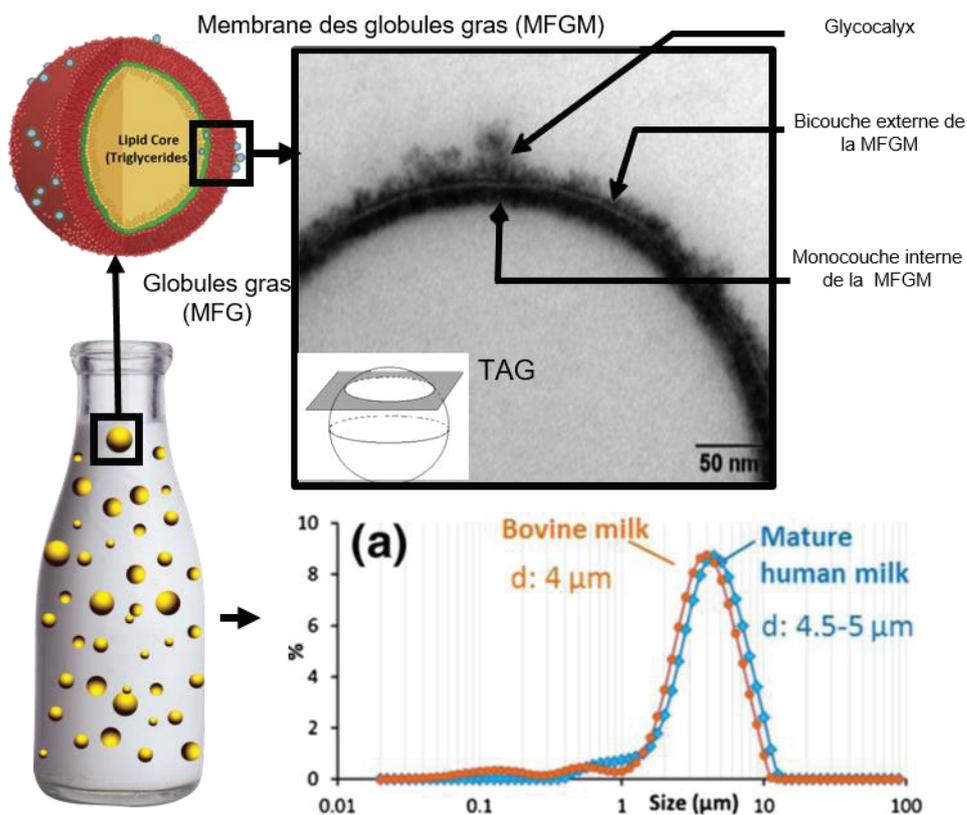


Figure 16. Globules gras dispersés dans le lait cru, distribution de taille des globules gras, schéma et image de microscopie électronique à transmission de la membrane des globules gras (adaptée de Gallier et al., 2015; Lopez et al., 2015 et Ortega-Anaya et al., 2022).

Entre 1,5 et 4 milliards de globules gras sont présents dans un millilitre de lait de vache (Boutonnier, 2008). La taille des globules gras varie de moins de 200 nm à plus de 15 μm (Lopez, 2020). Le diamètre moyen se situe entre 2,5 et 4,5 μm (**Figure 16**). La taille des globules gras est dépendante de la race, de l'animal, du stade de la lactation, du régime alimentaire et de la saison (Lopez, 2020). Les globules gras bovins ont un diamètre moyen de 4 μm , tandis que les MFGs de laits de chèvre (3,19 μm), de chamelle (2,99 μm) et de brebis (3,78 μm) sont plus petits. Les MFGs de lait de bufflonne (8,7 μm) sont eux, beaucoup plus grands (El-Zeini, 2006).

Toutes les interactions entre les globules gras et la phase aqueuse s'opèrent à travers la MFGM. Dans les conditions physico-chimiques du lait cru (**Tableau 4**), les globules gras sont en suspension dans la phase aqueuse du lait cru. La stabilité de la phase grasse repose sur les charges négatives de la membrane des globules (MFGM) au pH du lait (pH 6.7 ; **Tableau 4**) provoquant un phénomène de répulsion électrostatique et retenant chaque globule gras à distance. En raison de la différence de densité entre la phase aqueuse et les globules gras (densité = 0,92), les globules gras remontent spontanément et lentement à la surface formant une couche de crème enrichie en globules gras (Loi de Stokes ; (Bird, 1991)).

Lors d'un phénomène d'instabilité, les globules gras peuvent se rencontrer et conduire à différents phénomènes comme la floculation ou la coalescence (**Figure 17**). La floculation ou agrégation est un processus réversible au cours duquel les globules gras en suspension s'agglomèrent. L'agrégation des globules gras est favorisée à basse température grâce à des cryoglobulines (Euber and Brunner, 1984). La coalescence est un processus irréversible qui correspond à la fusion de plusieurs globules gras.

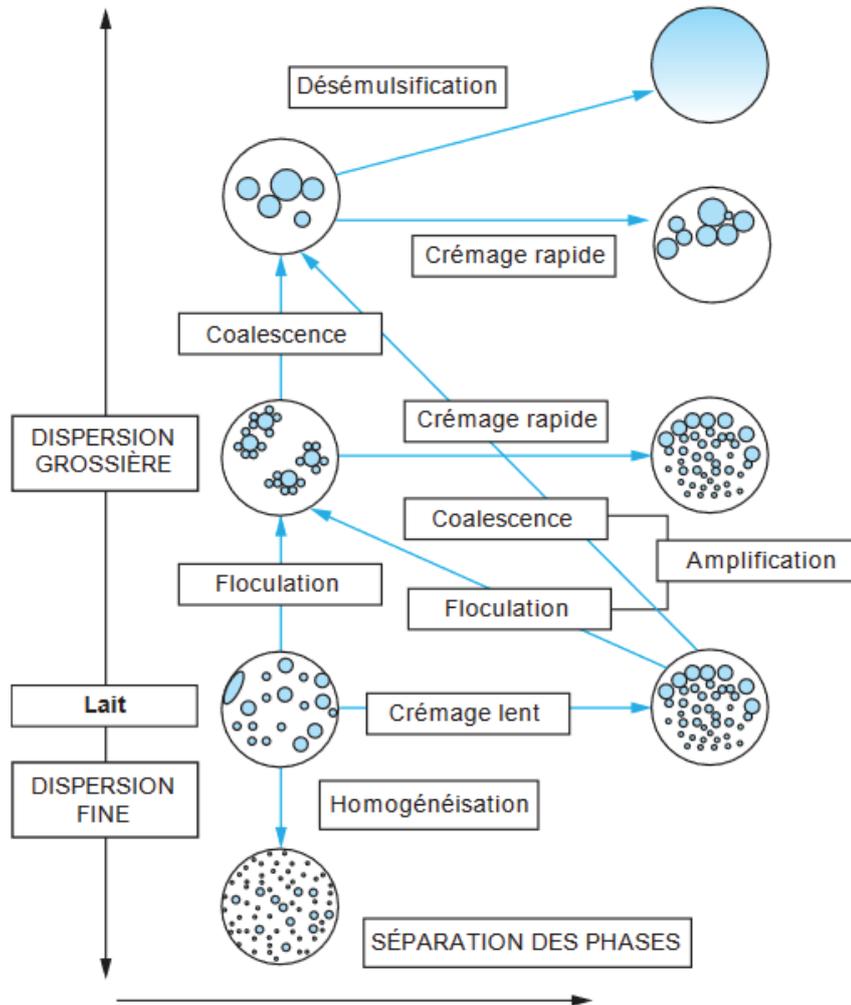


Figure 17. Représentation schématique de la déstabilisation de l'émulsion du lait cru. La phase aqueuse apparaît en blanc et la phase grasse/globules gras en bleu (d'après Boutonnier, 2008).

La quantité de matière grasse du lait cru est estimée entre 35 à 45 g.L⁻¹ (**Tableau 5**) et se compose en moyenne de 96 % de triglycérides, de phospholipides (1 %) et d'une fraction insaponifiable (1 %) constituée en grande partie de cholestérol (Boutonnier, 2008). La matière grasse du lait cru est caractérisée par une très grande variété d'acides gras (Lindmark Månsson, 2008). Plus de 400 acides gras ont été identifiés dont la majorité sont des acides gras saturés à hauteur de 60 à 70 % (acide stéarique, palmitique, butyrique), une minorité d'acides gras insaturés (30 à 35 % ; acide oléique, palmitoléique), et peu d'acide gras polyinsaturés (acide linoléique) (Boutonnier, 2008). La matière grasse du lait contient également des vitamines liposolubles : les vitamines A, D, E et K (Gaucheron, 2011). Les lipides apportent de l'énergie dont certains sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme en agissant sur des fonctions vitales telles que la coagulation sanguine ou l'inflammation (Palm and Rodenfels, 2020). Ils sont aussi utilisés par notre corps pour la formation des membranes phospholipidiques des cellules.

C.3.2. Origine des globules gras du lait cru et de leur membrane

La structure des globules gras du lait cru est liée aux mécanismes impliqués dans la formation des gouttelettes lipidiques au sein des cellules sécrétrices et à leur mode d'expulsion (**Figure 18**). Leur cœur lipidique, composé de triacylglycérols (TAG) est synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) des cellules lactifères. Lors de la sécrétion du RE, le cœur des TAG s'entoure d'une membrane interne composée de protéines et de lipides qui lui permettent de se disperser dans le cytoplasme (Lopez, 2020). Les microgouttelettes lipidiques ainsi formées fusionnent ensemble pour en former de plus grosses avant d'être sécrétées dans la lumière des alvéoles (Singh and Gallier, 2017). Lors de leur sécrétion, les microgouttelettes s'enveloppent de la bicouche phospholipidique originelle de la cellule sécrétrice (Keenan and Mather, 2006). Cette bicouche lipidique mesure environ 10 à 20 nm d'épaisseur (Lopez et al., 2008). Les globules gras ainsi formés présentent alors une triple couche phospholipidique constituant la membrane biologique (MFGM) qui a une épaisseur d'environ 10 à 50 nm (**Figure 16**). La MFGM expose les composants structurels de la membrane de la cellule sécrétrice et permet de stabiliser l'émulsion dans la phase aqueuse du lait. Une partie du cytoplasme de la cellule sécrétrice peut également être déversée dans le lait ou être emprisonnée au sein de la membrane des globules gras lors de la sécrétion des globules gras (Reinhardt and Lippolis, 2006).

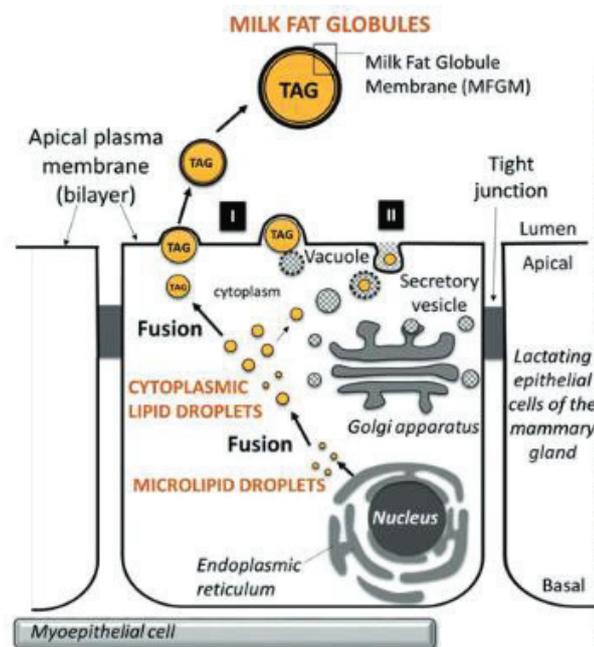


Figure 18. Origine intracellulaire, croissance, transit et sécrétion des globules gras du lait (d'après Lopez, 2020)

C.3.3. La membrane du globule gras (MFGM)

Les MFGs se distinguent d'autres formes naturelles d'organisations de matières grasses par la présence de la membrane biologique (MFGM) qui entoure le noyau de TAG, et en fait son originalité et sa spécificité. En effet, d'autres organisations supramoléculaires complexes de la matière grasse sont également décrites, comme les lipoprotéines dans le jaune d'œuf ou les corps lipidiques aussi appelés oléosomes dans les graines oléagineuses qui sont recouverts d'une monocouche de phospholipides, de stérols et de protéines (Meynier and Genot, 2017).

La MFGM représente 3 à 3,9 % de la crème et se compose principalement de lipides (64 à 71,8 %) et de protéines membranaires (22,3 à 28 %) (**Figure 19**). À la surface de la MFGM, environ 10 % de glycoconjugués (glycolipides et glycoprotéines) sont retrouvés (Ross, 2016). Les lipides de la MFGM représentent environ 1 % des lipides totaux du lait cru et présentent un mélange unique de phospholipides (glycérophospholipides et sphingolipides principalement) (Ortega-Anaya et al., 2022).

La structure de la MFGM est dynamique, et les lipides et les protéines qui la composent sont distribués de manière hétérogène (Evers et al., 2008). La MFGM est essentiellement une matrice fluide désordonnée, composée de lipides polaires insaturés (phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylinositol (PI)). Sont retrouvés également, deux types de microdomaines distincts : (i) des microdomaines riches en glycoprotéines et (ii) des microdomaines lipidiques ordonnés, que l'on trouve dans la bicouche externe, riches en sphingomyéline (SM) et cholestérol (**Figure 19**). Ces microdomaines lipidiques ordonnés sont appelés « radeaux lipidiques » (*lipid raft*).

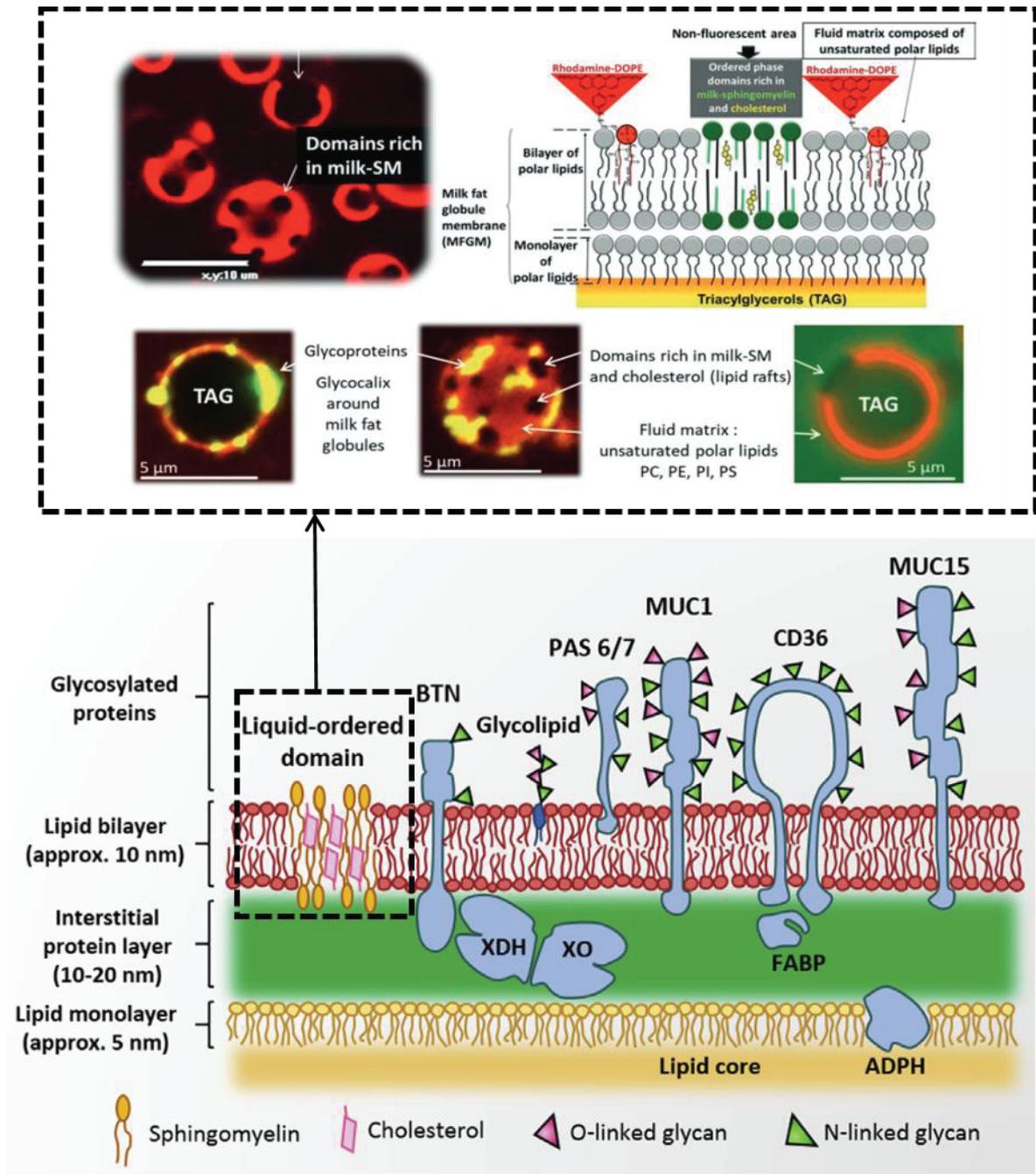


Figure 19. Schéma de la MFGM (d'après Ortega-Anaya et al., 2022) et images de microscopie confocale à fluorescence montrant l'hétérogénéité structurelle de la MFGM composés de microdomaines riches en glycoconjugués et des radeaux lipidiques (encart, d'après Lopez, 2020).

Les protéines de la MFGM représentent moins de 4 % des protéines totales du lait bovin (Murgiano et al., 2009) et 25 % à 70 % de la masse du matériel membranaire récupéré des globules gras du lait (Ortega-Anaya et al., 2022). Plus de 600 protéines de la MFGM dans le lait bovin ont été identifiées (Ortega-Anaya et al., 2022). Le **Tableau 6** présente les principales caractéristiques des protéines et glycoprotéines majoritaires de la MFGM du lait bovin.

Tableau 6. Protéines majeures de la MFGM (adapté de Ortega-Anaya et al., 2022).

Protéine	Masse moléculaire	Fonctions	Glycosylation*
Mucin 1 (MUC-1)	250-450 kDa	Anti-infectieux contre les bactéries et les virus en empêchant leur liaison aux cellules intestinales.	Protéine hautement glycosylées (60 % du poids total) composant le glycocalix. Principalement des O-glycosylations et également des N-glycosylations. Résidus d'acide sialique, Man, Gal, Fuc, GalNAc and GlcNAc.
Xanthine déshydrogénase / oxydase (XDH / XO)	150 kDa	Protège la glande mammaire et l'intestin des nouveau-nés contre les infections bactériennes par la production de peroxyde d'hydrogène et d'oxyde nitrique. Localisé entre la couche interne et la bicouche externe de la MFGM.	-
Mucine 15 (MUC-15)	96-100 kDa	Pas de fonction connue. Représente près de 1,5 % du total des protéines MFGM.	Fait partie du glycocalyx. Principalement des O-glycosylations et également des N-glycosylations. Résidus d'acide sialique.
Cluster de différenciation 36 (CD36)	77 kDa	Récepteur du collagène et des thrombospondines (protéines qui bloquent la croissance des vaisseaux sanguins). Récepteurs éboueurs (Scavenger receptor) des cellules en apoptose. Impliquées dans le transport des acides gras à longue chaîne.	Fortement glycosylée représentant 24 % du poids total. Principalement N-glycosylations avec des résidus Man, Gal, Fuc, GalNAc et GlcNAc.
Butyrophiline (BTN)	66 kDa	Membre de la superfamille des immunoglobulines. Protéine adhésive. Agit comme un récepteur. Effet positif sur le système immunitaire. Co-inhibiteur de l'activation des cellules T. Protéine la plus abondante du MFGM (50 % des protéines totales)	N-glycosylations avec des résidus Fuc et LacdiNAc.
Adipophiline (ADPH)	52 kDa	Facilite le transport des triglycérides et d'acides gras entre le réticulum endoplasmique et les gouttelettes en formation pendant la sécrétion des MFGs.	-
PAS 6/7 ou lactadhérine	48-54 kDa	Propriétés adhésives avec et impliqué dans la régulation de la coagulation. Impliquée dans l'inhibition du rotavirus.	O-glycosylations avec des résidus Man, Fuc, Gal, GalNAc, GlcNAc, d'acide sialiques et Neu5Ac.
Protéine de liaison aux acides gras (FABP)	13 kDa	Inhibe la croissance de lignées cellulaires tumorales. Impliqué dans le transport des acides gras dans le cytoplasme. Peut se lier au CD36.	

Fuc : Fucose ; Gal : Galactose ; GalNAc : N-acétylgalactosamine ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; LacdiNAc : N,N-diacétyllactosamine ; Man : Mannose ; Neu5Ac : Acide N-acétylneuraminique.

*La glycosylation correspond à l'ajout d'oligosaccharides au cours de la biosynthèse de certaines protéines. On distingue deux grandes catégories de glycosylation : la N-glycosylation et la O-glycosylation, selon les acides aminés qui vont porter ces résidus sucrés, asparagine et sérine ou thréonine, respectivement.

C.3.4. Avantages pour la santé des macromolécules de la MFGM

La MFGM est une source importante de protéines et de lipides, dont beaucoup sont glycosylés (**Figure 19** et **Tableau 6**) et présentent des fonctions bénéfiques pour la santé humaine. Néanmoins, le mode d'action des composants de la MFGM dans les processus bénéfiques pour la santé humaine est mal compris. Toutefois, il existe plusieurs évidences. Au niveau intestinal, Bhinder et al., (2017) ont montré qu'une supplémentation en MFGM favorisait la profération des cellules intestinales et une plus grande richesse d'espèces dont une diminution du niveau de *Pseudomonadota* et augmentation du niveau de *Bacillota*. L'étude a également mis en avant un effet protecteur de la MFGM contre l'inflammation induite par la toxine de *C. difficile* (Bhinder et al., 2017). D'autres travaux ont montré que la MFGM peut neutraliser certaines toxines bactériennes dont la cytotoxine vacuolisante d'*Helicobacter pylori* (VacA) (Wada et al., 2010), la toxine cholérique et la neurotoxine botulique de type A (Iwamori et al., 2008) et se lier aux shiga toxines (Herrera-Insua et al., 2001). Des travaux ont également mis en avant le rôle protecteur de la MFGM contre les infections à rotavirus (Newburg et al., 1998), à *L. monocytogenes* (Sprong et al., 2012) ou à STEC (Douëllou et al., 2018). Au niveau du cerveau, l'assimilation des MFGM améliore les performances cognitives, la myélinisation et le déclin cognitif (Ortega-Anaya et al., 2022). De plus, les récepteurs Toll-like et les protéines clusterine et ténascine impliquées dans le système immunitaire sont connues pour être des composants antibactériens et ont été identifiées de manière minoritaire lors d'analyses des protéines de la MFGM (Lee et al., 2018).

La glycosylation des composants de la MFGM laisse supposer que ces molécules agiraient comme des substrats compétitifs pour les sites de liaison sur les surfaces épithéliales des cellules intestinales (Spitsberg, 2005; Douëllou et al., 2017b). Le rôle principal des glycoconjugués de la MFGM semblerait être de fournir une protection contre les agents pathogènes (Ortega-Anaya et al., 2022). En effet, les protéines de la MFGM présentent des similarités avec celles retrouvées à la surface des cellules intestinales (Jiménez-Flores and Brisson, 2008). L'affinité des bactéries pour les globules gras du lait cru est connue depuis des années mais l'étude des mécanismes est récente. Les travaux actuels soutiennent que les mécanismes impliqués sont multifactoriels et probablement espèce ou souche spécifique (Kosmerl et al., 2021). Une étude menée sur les STEC a mis en évidence que la présence de globules gras du lait cru modulerait l'adhésion des STEC à la barrière intestinale des souris (Douëllou et al., 2018). Dans ce contexte, les globules gras du lait cru pourraient se comporter comme des leurres et prévenir l'infection à STEC.

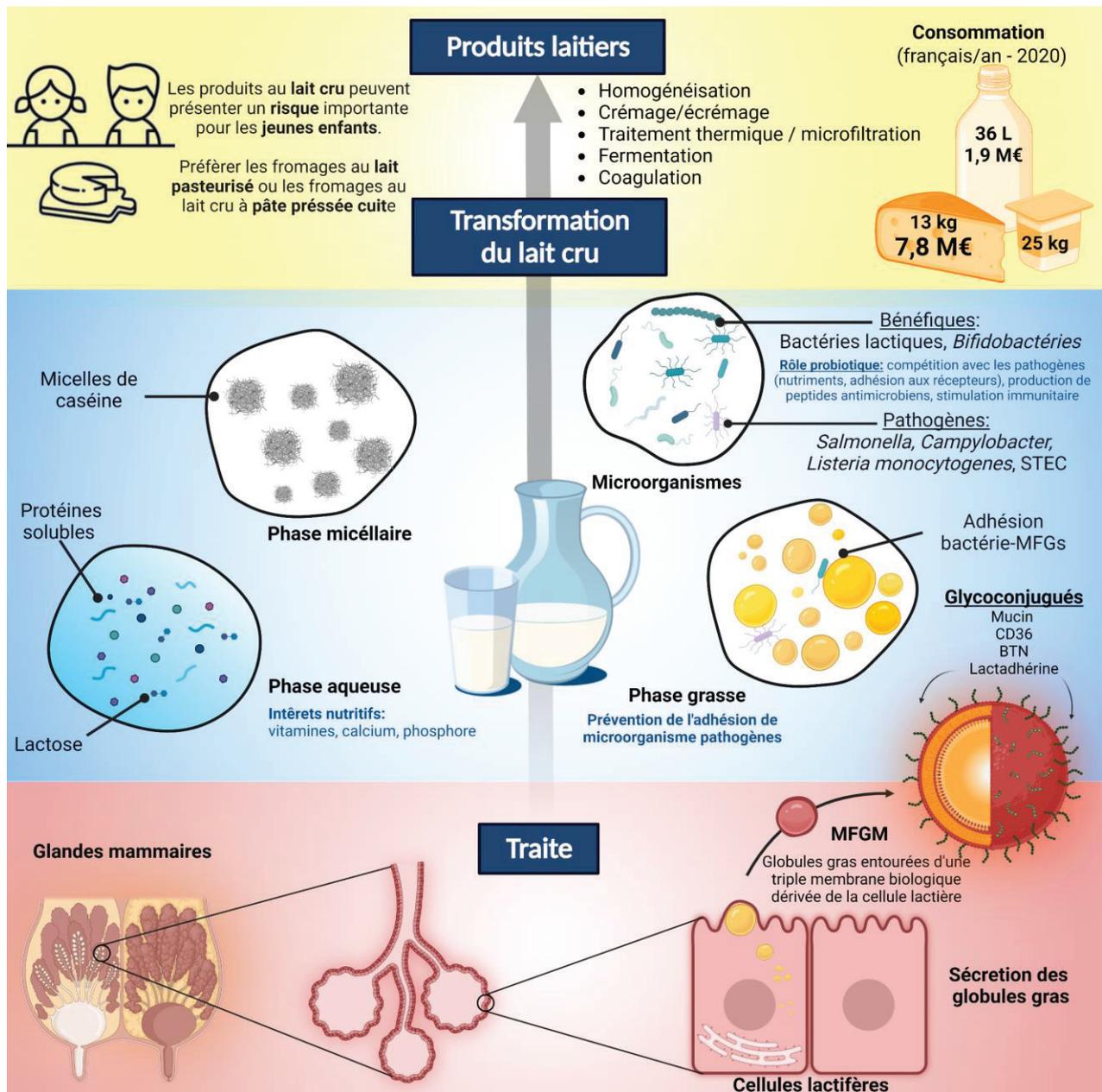


Figure 20. Schéma clé. Spécialiste des fromages au lait cru, la France a développé une économie autour des produits laitiers, réputés bons pour la santé. Dès sa sortie du pis, le lait cru est rapidement colonisé par les microorganismes de l'environnement de la ferme, majoritairement bénéfiques ou inoffensifs pour l'homme. Dans certaines circonstances, des microorganismes pathogènes peuvent coloniser le lait. L'absence d'un traitement thermique préserve ce microbiote naturel et ces propriétés bénéfiques associées et conséquemment le risque pathogène. Par soucis de prévention, les autorités françaises recommandent aux populations à risques, en particulier les enfants de moins de cinq ans, de ne pas consommer de produits au lait cru. Produit longtemps sous-estimé, la membrane des globules gras (MFGM) est riche en macromolécules bioactives dont des glycoconjugués ayant des propriétés antiadhésives contre certains entéropathogènes. La MFGM est une source prometteuse de nouvelles molécules fonctionnelles pour l'organisme humain en particulier la santé intestinale, la nutrition infantile et la protection contre des pathogènes entériques

Hypothèses de recherche

L'adhésion est une étape clé dans la colonisation environnementale des bactéries. Cette étape primaire est spécifique et elle est généralement conduite par des interactions moléculaires entre un récepteur et un ligand. Les aliments et notamment le lait cru contiennent divers ligands susceptibles d'inhiber l'adhésion des agents pathogènes à l'hôte comme des glucides libres ou associés à des protéines, agissant comme des ligands mimétiques pour les bactéries pathogènes. Par ailleurs, la membrane biologique qui entoure les globules gras du lait cru (MFGM) est connue pour présenter des composants similaires à ceux retrouvés dans l'environnement intestinal. La modulation de l'adhésion des STEC à la barrière intestinale par la présence des globules gras du lait cru (MFGs) a été démontrée, mais les mécanismes fins impliqués dans cette inhibition ne sont pas élucidés.

Comme la MFGM provient de la membrane biologique des cellules eucaryotes lactifères, nous avons émis l'hypothèse que les mécanismes d'association des STEC aux MFGs sont probablement similaires aux mécanismes d'adhésion aux cellules de l'hôte. Ainsi, nous avons supposé que l'association des STEC avec les MFGs du lait cru impliquerait des interactions moléculaires et spécifiques entre les protéines de surface des STEC et les protéines de la membrane des globules gras. De par l'aspect spécifique des mécanismes d'adhésion, l'affinité des STEC pour les globules gras pourrait être détournée à des fins préventives pour purifier le lait cru des STEC. De plus, à cause de la diversité des souches STEC, nous avons émis l'hypothèse que l'affinité et la nature de l'association pouvaient être dépendante du sérotype de la souche. Ainsi, nous avons construit ce projet autour de deux objectifs :

1. Évaluer l'association de souches STEC de différents sérotypes (majoritairement responsables d'infections humaines, à savoir O157:H7, O26:H11 et O103:H2) avec les globules gras du lait cru et la réduction du niveau des STEC dans le lait cru via l'élimination de la matière grasse (**Article 1**).
2. Identifier la nature de l'association STEC-MFGs et les composants moléculaires des STEC impliqués dans l'association (**Articles 2 et 3**).

Partie 2

Travaux expérimentaux

Chapitre 4. Affinité des STEC pour les globules gras du lait cru.....	91
Chapitre 5. Interactions aspécifiques et spécifiques entre les STEC et les globules gras.....	111
Chapitre 6. Implication des protéines de surface des STEC dans l'association STEC-MFGMPs.....	134

Chapitre 4

Affinité des STEC pour les globules gras du lait cru

Article de recherche n°1

Bagel, A. et al., 2022, Strain- and serotype-dependent affinity of Shiga Toxin-producing-*Escherichia coli* for bovine milk fat globules. *Journal of Dairy Sciences*. 105, 8688–8704

Les données supplémentaires sont présentées en Annexe 1.



Strain- and serotype-dependent affinity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* for bovine milk fat globules

A. Bagel,¹ M.-L. Delignette-Muller,² C. Lopez,³ V. Michel,⁴ D. Sergentet,^{1,5*} and T. Douellou¹

¹Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment Research Group, Université de Lyon, UMR 5557 Ecologie Microbienne Lyon, National Center of Scientific Research, VetAgro Sup, 69280 Marcy-l'Étoile, France

²Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR 5558, Université de Lyon, VetAgro Sup, National Center of Scientific Research, 69622 Villeurbanne, France

³INRAE, UR BIA, F-44316, Nantes, France

⁴Actalia, 74800 La Roche-sur-Foron, France

⁵VetAgro Sup—Campus Vétérinaire, Laboratoire d'Études des Microorganismes Alimentaires Pathogènes—

French National Reference Laboratory for *Escherichia coli* including Shiga toxin-producing *E. coli* (NRL-STEC), Université de Lyon, 69280, Marcy-l'Étoile, France

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are widely detected in raw milk products intended for human consumption. Although STEC are a worldwide public health problem, the pathogenicity of STEC in cheese remains unclear. In fact, bacterial association with compounds in raw milk cheeses could reduce their pathogenicity. A previous study showed the association of 2 STEC strains with raw milk cream in a natural creaming assay. Different concentrations of each strain were required to saturate the cream. In this study, we hypothesized that all STEC strains could be associated with milk fat globules (MFG) in raw milk and that the bacterial load required for saturation of the cream is serotype dependent. We evaluated the affinity of STEC strains belonging to the O157:H7, O26:H11, and O103:H2 serotypes for bovine raw milk cream and analyzed saturation of the cream layer by natural creaming assay. We used 12 STEC strains and 3 strains belonging to another pathotype to assess the effects of serotypes on this phenomenon. We performed sucrose density gradient centrifugation assays with 2 STEC model strains to confirm the results obtained by natural creaming. The localization of STEC within MFG-enriched creams was observed by confocal and electron microscopy. We recovered approximately 10 times more STEC from the cream layer after natural creaming than from raw bovine milk. The concentration of STEC required to saturate the cream layer (the saturation concentration) was estimated for each strain by nonlinear regression,

highlighting a strain and serotype effect. Moreover, the concentration of STEC in the cream was milk fat level dependent. However, even in nonsaturating conditions, a high level of STEC was still present in the aqueous phase, after fat separation. Thus, natural creaming should not be used as the sole preventive measure to remove STEC from naturally contaminated raw milk. The results of our study suggest that cream saturation is a complex mechanism, most likely involving specific interactions between STEC and raw MFG.

Key words: STEC, bovine raw milk cream, creaming, cream bacterial saturation, food microbiological safety

INTRODUCTION

Raw milk is a biological fluid produced by lactating mammals as a nutritional source for their young. It is an oil-in-water-type emulsion, consisting of an aqueous phase (>80%) in which lactose, whey proteins, and minerals are dissolved (Jost, 2007). The dispersed phase consists of casein micelles and milk fat globules (MFG), which account for at least 95% of the milk fat (Jost, 2007). Whole cow milk generally contains 35 to 40 g/kg of fat (Silanikove et al., 2015). Raw milk is slightly acidic or close to neutral pH and contains various ions. For example, bovine raw milk has a pH close to 6.7 to 6.8 and an ionic strength of 80 mM (Gaucheron, 2005; Nian et al., 2012).

Fermented raw milk products, such as raw milk cheeses, are consumed worldwide (Baschali et al., 2017; Arias-Roth et al., 2022). In some countries, they are part of the gastronomic heritage and contribute to regional socioeconomic development (Soni and Dey, 2014; Bagel and Sergentet, 2022). Raw milks, and therefore raw milk cheeses, have a rich microbiota from various environmental sources that are partly responsible for their organoleptic properties (Quigley et al., 2013; Inter-

Received January 18, 2022.

Accepted July 1, 2022.

*Corresponding author: delphine.sergentet@vetagro-sup.fr

national Dairy Federation, 2016). However, pathogenic bacteria including *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), and *Listeria monocytogenes*, may contaminate raw milk if poor hygiene practices have been applied during milking (EFSA BIOHAZ Panel, 2015). Surveillance and implementation of good practices at different steps of cheese production help to reduce the risk of contamination (FAO/WHO, 2021).

Raw milk and raw milk cheeses have been associated with foodborne STEC infections in humans from different countries (Honish et al., 2005; Espié et al., 2006; Baylis, 2009; Mungai et al., 2015; Perrin et al., 2015; Currie et al., 2018; FAO/WHO, 2019; Treacy et al., 2019). When STEC-contaminated milk is used to produce raw milk cheeses, STEC may survive and be ingested by the consumer. Therefore, the presence of STEC strains in milk and raw milk cheeses is a very important and complex issue for microbiological risk assessment and may result in significant economic losses for the industry. Pathogenic STEC have the potential to cause severe forms of infection, such as hemorrhagic colitis, and systemic complications in the form of hemolytic uremic syndrome, due to the action of Shiga toxins. Severe STEC-associated disease is more common in patients under 5 yr of age. The major STEC virulence factor is the Shiga toxin, which is encoded by the *stx* gene (ANSES, 2017). In addition, the locus of enterocyte effacement is found in most human-pathogenic STEC strains.

However, dairy products, in particular MFG, can have positive effects on the immune system, in part due to their antimicrobial properties (Ofek et al., 2003; Claeys et al., 2013; Yoon et al., 2016; Douëllou et al., 2018; Bagel and Sergentet, 2022). Bovine MFG are lipid droplets, with a mean diameter of 4 µm, formed by a core of triglycerides enveloped by a biological phospholipid triple membrane called the milk fat globule membrane (MFGM) (Kosmerl et al., 2021). The MFGM acts as an emulsifier, prevents coalescence of MFG, and protects triglycerides against lipase activity (Dewettinck et al., 2008). As a consequence of the mechanisms of milk fat secretion from mammary epithelial cells, the MFGM is a complex trilayered structure, comprising a monolayer of polar lipids derived from the endoplasmic reticulum and a bilayer of polar lipids originating from the apical plasma membrane of the mammary secretory cells (Keenan and Mather, 2006; Evers et al., 2008; Lopez, 2020). Thus, the outer bilayer of the MFGM contains diverse (glyco)-proteins and (glyco)-lipids on its surface (Reinhardt and Lippolis, 2006). These glycoconjugates form the glycocalyx and act as a source of specific bacterial and viral ligands (Spitsberg, 2005;

Douëllou et al., 2017b) that can vary during lactation (Wilson et al., 2008).

Bacterial affinity for MFGM surface components has been shown for various bacterial species, particularly for lactic acid and propionic bacteria (Brisson et al., 2010; Douëllou et al., 2017b; Gomand et al., 2018; Guerin et al., 2018). The work reported in Douëllou et al. (2018) examined the affinity of 2 STEC strains belonging to key serotypes (O157:H7 and O26:H11) for bovine raw cream. The affinity of these pathogenic strains for the bovine raw cream was limited. Cream layers were only saturated at high STEC concentrations in raw milk, and the 2 strains presented different saturation profiles. Based on these observations, we hypothesized that all STEC strains have an affinity for raw milk cream and MFG, and that this affinity is serotype dependent.

The objectives of this study were (1) to confirm the affinity of STEC for bovine raw milk cream using a large STEC strain collection; (2) to identify their localization in raw milk cream; and (3) to determine the possible effect of serotype and strain on this phenomenon.

During natural creaming, MFG spontaneously rise to the surface due to the difference in density between MFG and the aqueous phase of milk (Stokes' law; Bird, 1991). We performed natural creaming assays of raw milk experimentally contaminated with 12 STEC strains and 3 strains belonging to another pathotype to evaluate the affinity of STEC for cream. We contaminated milk with each strain separately, at different levels, to assess any strain-specific effects of the saturation concentration (SC). The phenomenon of saturation of STEC was affined with 2 model STEC strains. In addition, we studied the physical congestion of the cream layer by STEC and the effect of milk fat content on the level of STEC in cream, and we characterized the STEC cells that did not associate with MFG.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Culture Conditions

A total of 12 STEC (*E. coli* with the *eae* and *stx* genes) and 3 attaching-effacing *Escherichia coli* (AECC) strains (*E. coli* with the *eae* gene) were selected from the collection of the French National Reference Laboratory (VetAgro Sup, Marcy-l'Etoile, France). Details of STEC and AECC collection used in this study are presented in Table 1. This study included O157 and non-O157 strains: O157:H7 (n = 5), O26:H11 (n = 5), and O103:H2 (n = 5). We paid particular attention to

Table 1. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and attaching-effacing *E. coli* (STEC/AEEC) strain collection

Strain	Intimin and shiga toxin genotype	Origin	Detailed origin ¹	Isolation date	Reference
Serotype O157:H7					
SAKAI	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁺	Human	HUS	1996	Hayashi et al., 2001
EDL933	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁺	Human	HUS	1983	Perna et al., 2001
1044	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2012	French national STEC reference laboratory ²
5280-B	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2019	French national STEC reference laboratory
2044-A	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁻	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2016	French national STEC reference laboratory
Serotype O26:H11					
21765	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁺	Human	HUS	2005	Galia et al., 2015
11368	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁻	Human	HUS	2001	Ogura et al., 2007
103	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁻	Dairy product	HUS	2012	French national STEC reference laboratory
2157-A	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2018	French national STEC reference laboratory
4315-A	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁻	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2019	French national STEC reference laboratory
Serotype O103:H2					
PMK5	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁻	Human	HUS	1993	Mariani-Kurkdjian et al., 1993
32396	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁺	Human	HUS	2011	Mother and Child Hospital ³
1487-A	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2018	French national STEC reference laboratory
2503	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁻	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2012	French national STEC reference laboratory
445-14	<i>eae</i> ⁺ <i>stxI</i> ⁺ <i>stx2</i> ⁻	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2012	French national STEC reference laboratory

¹HUS = hemolytic uremic syndrome.

²French national STEC reference laboratory, VetAgro Sup, Marcy-l'Etoile, France.

³Mother and Child Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France.

the origin and virulence genes of the strains. For each sub-serotype, we used 2 strains isolated from human cases and 3 others from bovine raw milk cheese. We selected strains according to the presence of *stx1* or *stx2* ($n = 4$), or the absence of these genes ($n = 1$). The nonpathogenic *E. coli* K-12 str. MG1655 was also included in this study.

Bacteria were stored at -80°C in brain heart infusion (BHI, BioMérieux) supplemented with 30% glycerol. Bacteria were plated from glycerin-BHI frozen stock (-80°C) on Luria-Bertani agar plates (Oxoid) and incubated at 37°C for 24 h. The day before the experiments, one colony was picked from the plate and cultured overnight at 37°C in BHI. This procedure was performed for each experiment described herein. Shiga toxin-producing *E. coli* (*eae*⁺, *stx*⁺) are potentially highly pathogenic, and safety precautions must be taken when using these strains. If not otherwise specified, all experiments were performed in a biosafety level 3 laboratory.

Bovine Raw Milk

Bovine raw milk was purchased either from the local market or directly from farms (Lyon and surrounding towns, France). Raw milk was stored at 4°C and used within 3 d. The fat content of raw milk and the cream layer were quantified by Gerber's acid butyrometry method, according to the standard NF ISO 19662 (Agrolabs, Aurillac, France). For confocal laser scanning microscopy (CLSM) observations, milk from the morning milking was purchased directly from a farm.

E. coli Saturation Test in Bovine Raw Milk Cream by Natural Creaming Assay

Experimental Plan. A diagram describing the experimental plan design is available in supplemental data (Supplemental Figure S1; <http://dx.doi.org/10.17605/OSF.IO/K86TA>; Bagel et al., 2022). For each *E. coli* strain, an adequate volume of overnight bacterial suspensions, containing approximately 5×10^9 cfu according to the optical density (OD_{600})/cfu per mL relation, was centrifuged for 5 min at $5,000 \times g$ at $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ using a Sorvall ST 16R centrifuge (Thermo Fisher Scientific). The pellets were suspended in 50 mL of raw bovine milk to obtain a final concentration of approximately $8 \log_{10}$ cfu/mL. Three different milks were used and were contaminated with independent STEC cultures. Suspensions were 10-fold serially diluted in raw milk to obtain four 45-mL samples of contaminated raw bovine milk for each strain. The samples contained approximately $8 \log_{10}$, $7 \log_{10}$, $6 \log_{10}$, or $5 \log_{10}$ cfu/mL. We collected three 100- μL aliquots from each *E. coli*-contaminated milk, serially diluted the aliquots in tryptone salt broth, and immediately plated them in duplicate on *E. coli* Brilliance medium (ECB, Thermo Fisher). We used a Whitley Automated Spiral Plater (AES Chemunex, BioMérieux) to enumerate *E. coli*. Plates were incubated for 18 to 24 h at 37°C , and colonies were counted. Raw milk suspensions were placed at 4°C for 16 to 24 h, to allow natural cream separation (creaming). After creaming, the volume of the cream layer was evaluated by reading directly on the tube (Falcon tube, 50 mL, Corning Life Sciences). We col-

Table 2. Media and growth conditions used for raw milk microbiological analysis

Microbiological class	Agar plate	Growth conditions
Total mesophilic flora	Plate count agar (PCA, Oxoid) + 0.1% skim milk (Regilait)	30°C; 72 h
<i>Enterobacteria</i>	Violet red bile glucose agar (VRBG, Biokar)	37°C; 24 h
Mesophilic coliforms	Violet red bile lactose agar (VRBL, Biokar)	30°C; 24 h
Thermotolerant coliforms	Violet red bile lactose agar (VRBL, Biokar)	44°C; 24 h
<i>Escherichia coli</i> , β -glucuronidase positive	Tryptone bile X-glucuronide medium (TBX, Oxoid)	44°C; 24 h
<i>Escherichia coli</i> and coliforms	Brilliance <i>E. coli</i> /Coliform-selective agar (ECB, Oxoid)	37°C; 24 h

lected three 100- μ L samples from the cream layer in each tube, taking care to sample different areas. *Escherichia coli* were enumerated as previously described for raw milk.

In addition, total microflora, mesophilic coliforms, thermotolerant coliforms, *Enterobacteria*, and *E. coli* of raw milk used were counted. Briefly, raw milk was serially diluted in tryptone salt medium (BioMérieux), plated twice on specific media, and incubated according to manufacturer recommendations (Table 2).

Estimation of SC by Nonlinear Regression. For each tube, the concentration of *E. coli* in milk (C_{milk} , in cfu/mL) and in cream (C_{cream} , cfu/mL) was estimated by the sum of the 3 bacterial counts divided by the total volume of the 3 samples. We hypothesized that if STEC strains have an affinity for MFG in milk, STEC cells would be concentrated in the cream layer. The concentration of STEC in the cream should thus be dependent on the cream concentration factor (a). The concentration of STEC did not affect the volume of cream (V_{cream} , in mL); therefore, for each tube, a is only dependent on the milk and is equal to the ratio of the volume of milk (V_{milk} , mL) to the volume of cream (V_{cream} , mL).

Thus, if our hypothesis is true, STEC cells are all concentrated in the cream. If a saturation phenomenon exists, we expect this relation to be true only for low C_{milk} , whereas C_{cream} would reach a saturation (C_{max}) at high C_{milk} from a concentration threshold, which we called the SC. The SC may depend on the STEC strain. We estimated the SC for each STEC strain from observed data, assuming SC does not depend on the milk. For this purpose, we fitted the following simple model for each STEC strain to the C_{cream} values obtained:

$$C_{cream_{ij}} = C_{milk_{ij}} \times a_j \text{ if } C_{milk_{ij}} < SC,$$

and

$$C_{cream_{ij}} = SC \times a_j \text{ if } C_{milk_{ij}} \geq SC,$$

with i the index for milk serial dilutions ($i = 1$ to 4), and j the index for milks ($j = 1$ to 3).

In this model, only the threshold parameter SC is estimated for each strain, the values of a_j being calculated as V_{milk_j} / V_{cream_j} for each milk j . We estimated SC by nonlinear regression using the nls() function of R software (R Core Team, 2021) after logarithmic transformation of the concentrations to respect the hypothesis of the Gaussian error model:

$$\log_{10}(C_{cream_{ij}}) = \log_{10}(C_{milk_{ij}}) + \log_{10}(a_j) \text{ if } C_{milk_{ij}} < SC,$$

and

$$\log_{10}(C_{cream_{ij}}) = \log_{10}(SC) + \log_{10}(a_j) \text{ if } C_{milk_{ij}} \geq SC.$$

***E. coli* Saturation Test in Bovine Raw Milk Cream by Sucrose Density Gradient Centrifugation Assay**

Experimental Plan. A diagram describing the experimental plan design is available in the supplemental data (Supplemental Figure S2; <http://dx.doi.org/10.17605/OSF.IO/K86TA>; Bagel et al., 2022). Three bovine raw milk samples were spiked to 10 log₁₀ cfu/mL with each selected STEC strain, as previously described in the natural creaming assays. The strains O157:H7 str. EDL933 and O26:H11 str. 21765 were selected as model strains due to their different affinities for cream (these strains showed the highest and lowest SC). All STEC-spiked raw milk suspensions were 10-fold serially diluted with raw milk to obtain a range of contaminated milk concentrations for each strain and were incubated at 4°C for 30 min to allow STEC-MFG adhesion. All STEC-contaminated raw milks were 10-fold serially diluted in tryptone salt and plated in duplicate on ECB medium (18–24 h at 37°C) to enumerate STEC. Then, to separate STEC cells associated with MFG from those that were not, a sucrose density gradient (SDG) centrifugation assay was used as described in Brisson et al. (2010). Briefly, 4 mL of each *E. coli*-contaminated milk was added to the top of a double phase system consisting of 5 mL of 20% sucrose and 5 mL of 60% sucrose (Sigma Aldrich, Merck). Samples were then centrifuged at 4,000 \times g for 30 min at 4°C. Both MFG

and STEC-MFG complexes have a lower density than sucrose solutions and, therefore, rise to the surface with a minimal amount of raw milk proteins, whereas STEC not associated with MFG are pelleted. The MFG and STEC-MFG complexes were recovered with a sterile spatula and dispersed in 4 mL of sterile PBS (Sigma Aldrich, Merck). Creams were enumerated for STEC as previously described for raw milk.

Estimation of SC by Nonlinear Regression. For each condition, we disposed of the measured concentration of STEC in milk (C_{milk_i} , in cfu/mL) and in cream (C_{cream_i} , cfu/mL). As previously described, we fitted the following simple model for each STEC strain to values of C_{cream} obtained:

$$C_{cream_i} = C_{milk_i} \times a \text{ if } C_{milk_i} < SC,$$

and

$$C_{cream_i} = SC \times a \text{ if } C_{milk_i} \geq SC,$$

with i the index for milk serial dilutions ($i = 1$ to 4). In this experiment, the volume of cream was resuspended in the same volume of milk; thus, $a = 1$ for each milk.

Evaluation of Cream Physical Congestion by Competitive *E. coli* Saturation Test

Competitive natural creaming of raw milk was performed with 2 STEC: O157:H7 str. EDL933 and O26:H11 str. 21765. Strains were selected according to their affinity for the cream layer (high and low SC) and the colony phenotype on ECB medium. In our collection, only O157:H7 strains are β -glucuronidase negative (GUD⁻) and cannot cleave the chromogenic substrate X-Glu added to the ECB medium. Strains belonging to O26:H11 or O103:H2 serotypes appear as purple colonies (LAC⁺, GUD⁺), whereas O157:H7 strains appear pink (LAC⁺, GUD⁻) on ECB agar plates. Natural creaming assays were carried out following the protocol described in the previous section, with several modifications. Raw milk was experimentally spiked to 8 log₁₀ cfu/mL with O157:H7 str. EDL933 and O26:H11 str. 21765, and placed at 4°C for 18 to 24 h. Raw milk was also spiked to 8 log₁₀ cfu/mL with each strain for the control experiment (no competition). Creaming with no enrichment step (no STEC) was also performed, to estimate the natural microflora in the cream layer. Purple and pink colonies were enumerated from cream and raw milk and were identified as the 21765 and EDL933 strains, respectively. The serogroup of the colonies was verified by agglutination tests (Slidex *E. coli* O26, BioMérieux; *E. coli* O157 Latex, Oxoid, Thermo Fisher

Diagnostics). Dual- and single-strain creaming assays were performed in triplicate (3 independent cultures).

Effect of Fat Content on STEC Concentration in Cream

To confirm the role of milk fat in the phenomenon of saturation, we performed an SDG centrifugation assay as previously described but with diluted raw milk. Raw milk was diluted 2-fold or 10-fold with UHT skimmed bovine milk and experimentally spiked to 6 log₁₀ cfu/mL with O157:H7 str. EDL933 or O26:H11 str. 21765.

Evaluation of Adhesion Capacity of Non-Adherent STEC Cells

To confirm the phenotype of STEC cells that did not associate with MFG, pelleted STEC cells were used to spike uncontaminated raw milk, and the SDG centrifugation test was performed several times. Raw milk was spiked with the O157:H7 str. EDL933 to a final concentration of 6 log₁₀ cfu/mL and incubated at 4°C for 30 min. Then, 10 mL of spiked milk was added to the top of a double-phase system consisting of 15 mL of 20% sucrose and 15 mL of 60% sucrose in a 50-mL tube. Samples were then centrifuged at 4,000 × g for 30 min at 4°C, as previously described. Milk fat globules were recovered with a sterile spatula and dispersed in 10 mL of sterile PBS. Sucrose solutions were gently removed with a vacuum pump. Pellets containing unassociated bacteria were transferred to a new tube, washed with 5 mL of sterile PBS, and pelleted again by centrifugation for 5 min at 5,000 × g at 4°C. Washed pellets were used to spike 10 mL of uncontaminated bovine raw milk and were treated as previously described. In total, 3 cycles of contamination – centrifugation – pellet isolation – contamination were performed. Both MFG and spiked raw milk were 10-fold serially diluted in tryptone salt, plated in duplicate on ECB medium, and incubated for 18 to 24 h at 37°C to enumerate STEC. The concentration of STEC in the pellet was determined by enumeration of STEC in the newly contaminated raw milk. Each experiment was repeated to ensure reproducibility (i.e., 2 different cultures were performed).

Microscopic Observations

Confocal Laser Scanning Microscopy. Confocal laser scanning microscopy was used to localize *E. coli* cells in bovine raw cream. With a Nikon A1R microscope (Nikon) installed in a non-biosafety level 3 laboratory, the model strain AEEC O26:H11 was used for CLSM observations, and the experiments were realized in a BSL-2 laboratory. Raw bovine milk was inoculated

with AEEC O26:H11 at $5 \log_{10}$ cfu/mL and stored at 4°C for 16 to 18 h. The cream obtained by natural creaming of MFG as a function of time upon storage was recovered and used for CLSM observations. Briefly, 100 μ L of the cream sample was stained using the following method. A specific fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) anti-O26 antibody (BioMérieux) was used to visualize the O26 *E. coli* strain (FITC anti-O26 concentration, 14 μ g/mL). The triglyceride core of the MFG was stained with Nile Red fluorescent dye (5H-benzo- α -phenoxazine-5-one,9-diethylamino, Sigma Aldrich; 50 μ g/mL in propanediol). After labeling, samples were kept for 30 min at $19 \pm 1^\circ\text{C}$ in the dark. Labeled samples were then diluted 1:2 in milk ultrafiltration permeate. Some samples were observed after 4 h at room temperature to promote *E. coli* growth and facilitate their localization in the cream sample. The experimentally contaminated labeled creams were observed with a 60 \times oil immersion objective. The samples (3 μ L) were loaded between sealed coverslips. Both FITC and the Nile Red fluorescent dyes were visualized at 488/515 nm and 560/595 nm ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$), respectively. The 2-dimensional images had a resolution of 512×512 pixels, and the pixel scale values were converted into micrometers using a scaling factor. In the multiple labeled samples, different colors were used to locate the fluorescent probes (e.g., red for triglyceride stained with Nile Red, green for *E. coli* cells stained with FITC anti-O26).

Transmission Electron Microscopy. The MFG were washed to remove unadsorbed proteins from the samples, using a protocol adapted from (Patton and Huston, 1986). Briefly, raw milk samples were warmed to 40°C, and then 10 mL of milk was mixed with 5 mL of a 0.22- μ m-filtered 50% (wt) sucrose solution. The milk/sucrose sample was deposited at the bottom of a 50-mL centrifuge tube filled with 30 mL of a 5% (wt) sucrose solution. Centrifugation was performed at $1,600 \times g$ for 20 min at $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ to form a layer of washed MFG at the top of the tubes. The top layer, containing the washed MFG, was collected in an adequate volume of phosphate buffer (43 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; pH = 6.8; ionic strength = 80 mM) to approximate the pH and ionic strength of milk. Sucrose, NaH_2PO_4 , and Na_2HPO_4 were supplied by Sigma Aldrich (Merck).

Purified MFG were contaminated with approximately $8 \log_{10}$ cfu/mL of a stationary STEC or AEEC culture (BHI, 37°C) and kept for 2 h at $19^\circ\text{C} \pm 1$ to allow association. Contaminated creams were then labeled with 2 mg/mL cationized ferritin (Electron Microscopy Sciences, Delta Microscopies) for 30 min at $19^\circ\text{C} \pm 1$. Samples were then mixed with 3% low-temperature gelling agarose solution (Electron Microscopy Sciences)

maintained at 40°C (vol/vol). One hundred microliters was immediately placed into a disposable plastic 1-mm-thick mold. Solidified samples were cut into 1-mm³ blocks and then immersed in a 2% glutaraldehyde solution (0.2 M; cacodylate buffer; pH 7.2; Electron Microscopy Sciences) at 4°C. All pieces were rinsed 3 times in saccharose 0.4 M/cacodylate-Na-HCl, pH 7.4, 0.2 M (Electron Microscopy Sciences) for 1 h at 4°C and post-fixed with 2% OsO4 in cacodylate-Na-HCl, pH 7.4, 0.3 M (Electron Microscopy Sciences) for 1 h at 4°C. Afterward, samples were dehydrated in a graded series of ethanol and transferred to propylene oxide. Impregnation was performed with Epon epoxy resin (Electron Microscopy Sciences). Inclusion was obtained by polymerization at 60°C for 72 h. Ultrathin sections (approximately 70 nm thick) were cut on a UC7 (Leica) ultramicrotome, mounted on 200-mesh copper grids coated with 1:1,000 poly-L-lysine, stabilized for 1 d at room temperature, and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Sections were examined with a 1400JEM 120 kV transmission electron microscope (Jeol).

RESULTS

Affinity and SC of *E. coli* Strains in Bovine Raw Cream

To evaluate the affinity of STEC and AEEC strains for bovine raw MFG, natural creaming saturation tests were performed for a set of 16 *E. coli* strains (Table 1). Figure 1 shows the concentration of each *E. coli* strain in cream as a function of the initial concentration in raw milk with the regression curve for each milk ($n = 3$). All data are available in Supplemental Figure S3 (<http://dx.doi.org/10.17605/OSF.IO/K86TA>; Bagel et al., 2022). Table 3 shows the bacterial count of each raw milk used in this experiment.

The concentration of each *E. coli* strain in the cream obtained by natural creaming was $\sim 1 \log_{10}$ cfu/mL greater than the initial enrichment level (Figure 1). *Escherichia coli* strains were mainly recovered in the cream layer when the bacterial level in raw milk ranged from 5 to $7 \log_{10}$ cfu/mL or from 5 to $8 \log_{10}$ cfu/mL, depending on the strain (Figure 1). However, at higher inoculum levels—7 or $8 \log_{10}$ cfu/mL—the concentration of *E. coli* in the cream was limited; the cream layer appeared saturated by *E. coli*. The estimated SC were between 6.94 and $8.05 \log_{10}$ cfu/mL (minimum and maximum of SC) for STEC and AEEC strains (Figure 2). The saturation of the nonpathogenic *E. coli* K-12 str. MG1655 was also evaluated, and this strain showed the highest SC, estimated at

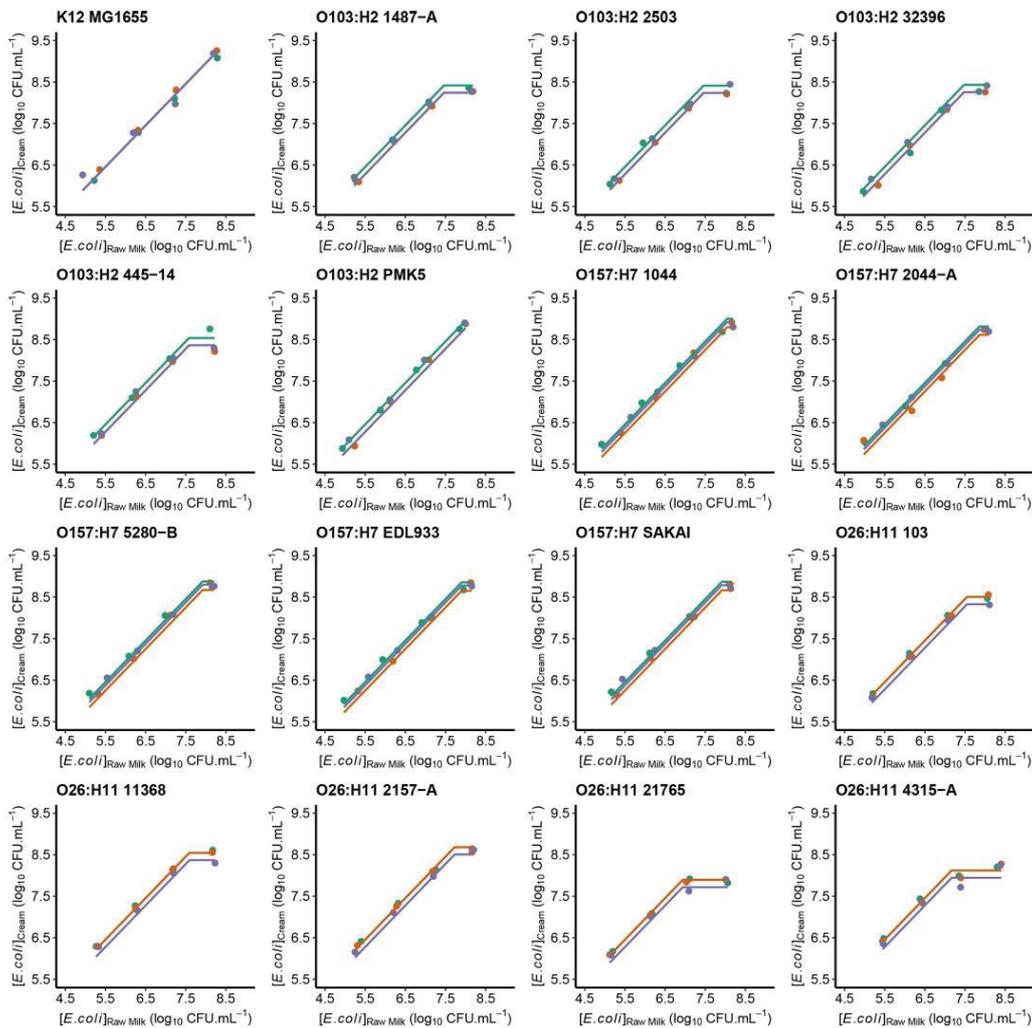


Figure 1. Saturation curves of *Escherichia coli* strains in raw milk cream obtained by natural creaming assay. The concentration of each *E. coli* strain in the raw milk cream layer as a function of its initial concentration in milk was plotted for each milk used (points) as well as the regression curve (flat line). Colors represent different milks ($n = 3$).

8.21 log₁₀ cfu/mL with a 95% confidence interval (CI) [7.98; 8.45]. The fitting procedure failed to estimate the CI of the O103:H2 str. PMK5, due to the lack of observed points in the saturation phase. An SC greater than the maximal contamination level ($C_{milk_{max}}$;

represented as black bars in Figure 2) means that the saturation point has not been reached. This was the case for 4 strains: PMK5, which had an undefined upper CI; the O157:H7 2044-A and 1044 strains; and the nonpathogenic *E. coli* K-12 str. MG1655 (Figures 1

Table 3. Bacterial counts (\log_{10} cfu/mL) of raw milk used in *Escherichia coli* saturation test in bovine raw milk cream by natural creaming assay¹

Milk sample	Total mesophilic flora	<i>Enterobacteria</i>	Mesophilic coliforms	Thermotolerant coliforms	<i>E. coli</i> and coliforms	<i>E. coli</i> , β -glucuronidase positive
1	4.74	2.53	1.00	<1	2.52	<1
2	5.90	4.56	4.06	1.02	4.98	<1
3	5.90	4.64	—	3.85	5.11	<1
4	4.74	3.23	4.10	—	2.40	<1

¹Raw milk samples were plated twice on specific media and incubated according to manufacturer recommendations (Table 2). The concentrations were estimated by the mean of duplicates. Not all strains have been characterized with the same milk, and a total of 4 milks were used.

and 2). The volume of cream obtained at the end of the natural creaming experiments and the calculated cream concentration factor, a parameter of the nonlinear model used for estimated SC, are presented in Table 4.

All strains belonging to the O26:H11 serotype saturated the cream layer and could be parsed into 2 groups based on the SC value. The cream layers were saturated at either $\sim 7 \log_{10}$ cfu/mL (4315-A and 21765 strains; group 1) or $\sim 7.5 \log_{10}$ cfu/mL (11368, 103, and 12157-A strains, group 2). However, both O26:H11 strain groups showed lower SC than the O157:H7 strains. The strains belonging to the O157:H7 serotype presented a very low intravariability compared with the other serotypes and displayed an SC at $\sim 8 \log_{10}$ cfu/mL. For the O103:H2 serotype, only the human-pathogenic PMK5

strain presented a distinct profile. The cream layer was not fully saturated in these conditions (Figure 1), and the model could not estimate the SC (Figure 2). The other O103:H2 strains displayed a similar SC at $\sim 7.5 \log_{10}$ cfu/mL.

The STEC associated with MFG were purified from raw milk using an SDG centrifugation test. The experiment was performed with 2 pathogenic STEC strains that showed extreme SC values: O157:H7 str. EDL933 and O26:H11 str. 21765. The majority of viable STEC cells were found in the cream fraction up to a concentration threshold (Figure 3A) as previously described for natural creaming experiments. The SC of the O26:H11 str. 21765 was estimated at $5.98 \log_{10}$ cfu/mL, whereas O157:H7 str. ELD933 saturated the cream at $7.22 \log_{10}$ cfu/mL (Figure 3B).

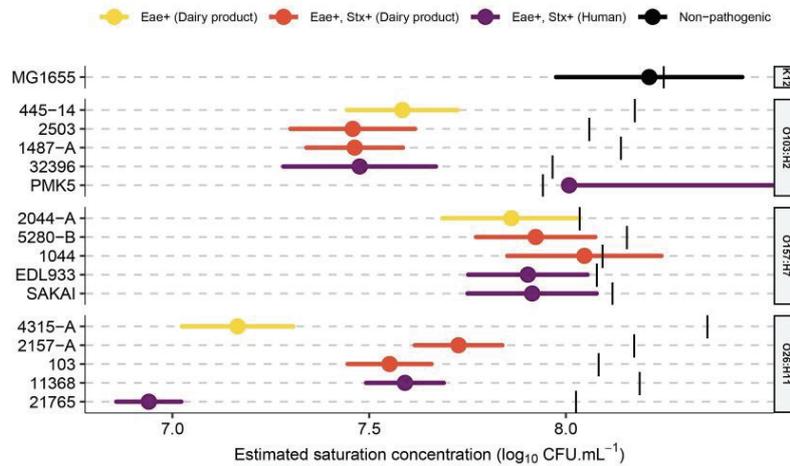


Figure 2. Estimation of the saturation concentration (SC) of *Escherichia coli* strains in the raw cream layer from natural creaming assay. Segments represent 95% CI. For the *E. coli* O103:H2 str. PMK5 strain, the model could not estimate CI. Black bars represent the mean of the maximal spiked level ($C_{milk,max}$). Strains with SC above this threshold were considered nonsaturating under these conditions. The genotype and the origin of the strains are indicated in different colors.

Table 4. Volume of the cream layer (V_{cream}) obtained by natural creaming assay and the \log_{10} of the concentration factor (a) for each strain and repetition

Serotype and strain	V_{cream} (mL); $\log_{10}(a)$		
	Repetition 1	Repetition 2	Repetition 3
O26:H11			
103	5; 0.95	5; 0.95	7.5; 0.78
11368	5; 0.95	5; 0.95	7.5; 0.78
2157-A	5; 0.95	5; 0.95	7.5; 0.78
21765	5; 0.95	5; 0.95	7.5; 0.78
4315-A	5; 0.95	5; 0.95	7.5; 0.78
O157:H7			
1044	5; 0.95	8; 0.75	6; 0.88
2044-A	5; 0.95	8; 0.75	6; 0.88
5280-B	5; 0.95	8; 0.75	6; 0.88
EDL933	5; 0.95	8; 0.75	6; 0.88
SAKAI	5; 0.95	8; 0.75	6; 0.88
O103:H2			
1487-A	5; 0.95	7.5; 0.78	7.5; 0.78
2503	5; 0.95	7.5; 0.78	7.5; 0.78
32396	5; 0.95	7.5; 0.78	7.5; 0.78
445-14	5; 0.95	7.5; 0.78	7.5; 0.78
PMK5	5; 0.95	7.5; 0.78	7.5; 0.78
K-12 MG1655	5; 0.95	5; 0.95	5; 0.95

Localization of the O26:H11 AEEC Strain Around MFG

In the CLSM images, the *E. coli* cells specifically labeled with FITC anti-O26 appeared as green cells (Figure 4A-1). As expected, MFG were concentrated in the cream. Our CLSM observations showed that the O26:H11 AEEC cells were located around some, but not all, MFG (Figure 4A). The AEEC cells were observed in close contact with an MFG (Figure 4A-5). In addition, some AEEC cells were visualized in the serum phase of the cream.

Using transmission electron microscopy, AEEC cells were observed in contact with the MFGM for each strain and serotype assayed (Figure 4B). For the strains belonging to the O157:H7 and O26:H11 serotypes, the largest side of bacterial cells was in contact with the MFGM. Pili were observed for some strains (Figure 4B-2, B-3), but no large extracellular appendages were visualized in contact with the MFGM.

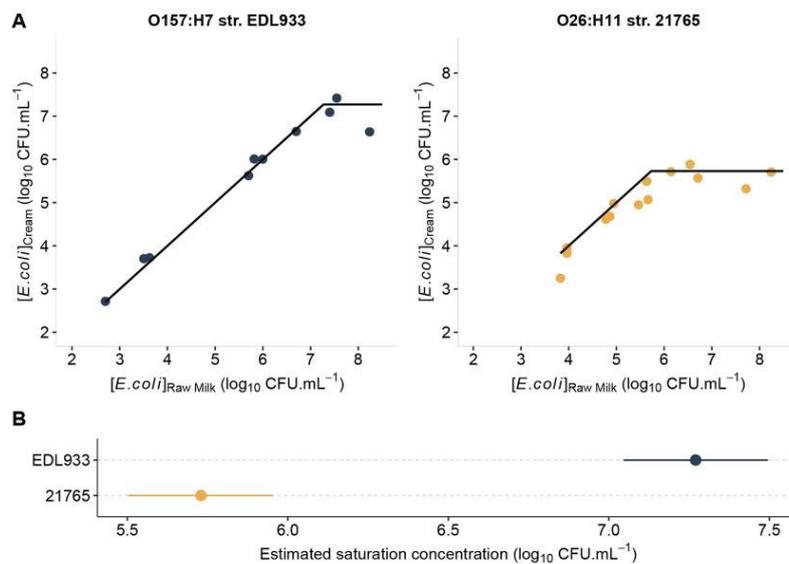


Figure 3. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* cream saturation assay obtained by sucrose density gradient centrifugation test. (A) Saturation curve of O157:H7 str. EDL933 and O26:H11 str. 21765 for raw milk cream. For each strain, the concentration in cream versus the initial concentration in milk was plotted (point), as well as the regression curve (flat line). (B) Estimation of the saturation concentration by nonlinear regression (filled circle). Segments represent 95% CI.

Spatial Congestion of *E. coli* Cells in Cream Evaluated by a Competitive Natural Creaming Assay

To evaluate whether bacterial spatial congestion could be responsible for the saturation of STEC in cream, we performed a competitive natural creaming assay, by experimentally spiking milk with 2 STEC strains with significantly different SC. The concentration of O157:H7 str. EDL933 in cream was 0.50 log₁₀ and 0.45 log₁₀ cfu/mL higher than the initial concentration in raw milk for the control and competition tests, respectively (Figure 5). The difference in bacterial concentration in cream was less than -0.08 log₁₀ cfu/mL for O26:H11 str. 21765 in both conditions (Figure 5). No difference was observed between the control (single strain) and competition (2 strains) samples. These data suggest that the O157:H7 str. EDL933 strain could still be concentrated in an already saturated cream.

Effect of Raw Milk Fat Content on STEC Concentration in Cream

The initial STEC concentration in raw milk was fixed to 6 log₁₀ cfu/mL. The STEC concentration in cream decreased as a function of fat content (Figure 6). The STEC concentration in cream from undiluted raw milk was 5.43 log₁₀ cfu/mL for O26:H11 str. 21765 and 5.89 log₁₀ cfu/mL for O157:H7 str. EDL933. With EDL933, a majority of STEC cells were recovered from the cream layer of raw milk, whereas for 21765, only half of the cells were recovered from the cream layer. In half-diluted raw milk, the concentrations were 4.94 log₁₀ cfu/mL for O26:H11 str. 21765 and 5.69 log₁₀ cfu/mL for O157:H7 str. EDL933. A greater difference in STEC concentration in cream was found when the raw milk was diluted to 1:10 to 3.634 log₁₀ cfu/mL for O26:H11 str. 21765 and 4.57 log₁₀ cfu/mL for O157:H7 str. EDL933. Therefore, although the trend was similar, an obvious strain effect occurred. We recovered less of the O26 strain than the O157 strain from cream for each dilution.

Characterization of STEC Cells That Do Not Associate With Raw Milk Cream

We also studied those STEC cells that did not localize in cream. The median of STEC concentration in cream was 6.5 log₁₀ cfu/mL, and the median concentration in the pelleted fraction was estimated to be 5.10 log₁₀ cfu/mL (Figure 7A). The pellet was used to contaminate new raw milk samples to study why

these cells did not localize in the cream. We found no difference in the concentrations of pelleted STEC cells between the first and the second cycle: ~1.5 log₁₀ cfu/mL less than the raw milk concentration for both cycles (Figure 7B). The majority of STEC cells were recovered in the cream for the first 2 cycles (Figure 7B). In the last purification-contamination cycle, more STEC cells were also recovered from the cream layer: 3.38 log₁₀ cfu/mL in the cream layer and 2.54 log₁₀ cfu/mL in the pellet (Figure 7A). However, the concentration of pelleted STEC cells was higher in the third cycle (~0.5 log₁₀ cfu/mL) than previous cycles (Figure 7B).

DISCUSSION

Historically, creaming was used to concentrate the fat of raw milk and to purify it from bacteria. During creaming, MFG spontaneously rise to the surface because they are less dense than the aqueous phase, forming an MFG-concentrated layer known as cream (Mulder and Walstra, 1974; Euber and Brunner, 1984; Bird, 1991). These observations suggest that the natural microbiota of raw milk have a certain affinity for raw milk fat. Unfortunately, pathogenic bacterial cells can contaminate raw milk, leading to human infection through ingestion of contaminated raw milk products. Shiga toxin-producing *E. coli* is a true challenge for the dairy industry, and better understanding of the behavior of this pathogen in dairy products is important to identify new preventive strategies. Therefore, in this study, we aimed to evaluate the affinity of STEC for raw milk cream, to better understand the concentration of this pathogen in cream and to discover whether this concentration varies according to serotype.

We used natural creaming assays to analyze the affinity of 12 STEC strains, 3 AEEC strains, and one non-pathogenic *E. coli* strain (K-12 str. MG1655) for raw milk cream (Figure 1). Our data showed that STEC cells were mainly recovered from cream. Approximately 1 log₁₀ cfu/mL more STEC was observed in the cream layer than in raw milk after natural creaming, indicating a 10-fold increase in STEC concentration in cream, compared with raw milk. Creaming was performed at a low temperature to limit bacterial growth. No STEC growth was observed in spiked raw milk after 24 h at 4°C (data not shown). Previous studies have shown that natural creaming can concentrate up to 500 times more bacteria in cream than in milk (Anderson, 1909; Lamson, 1918), which is significantly higher than the STEC concentration levels obtained in this study. Furthermore, in this study, the distribution of all strains in the cream was homogeneous (data not shown). Of note, *E. coli* K-12 str. MG1655, as well as the AEEC

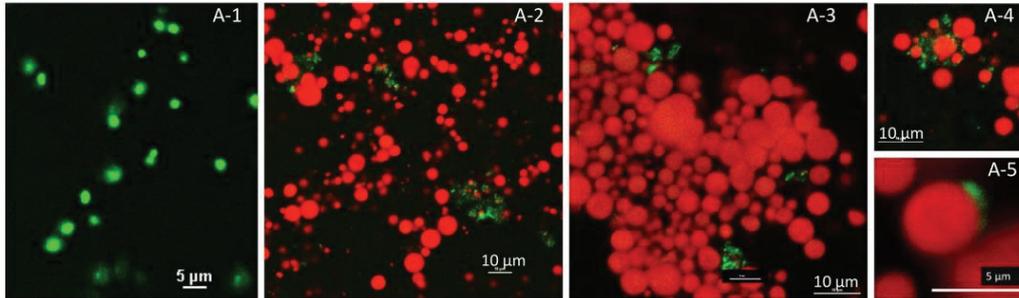
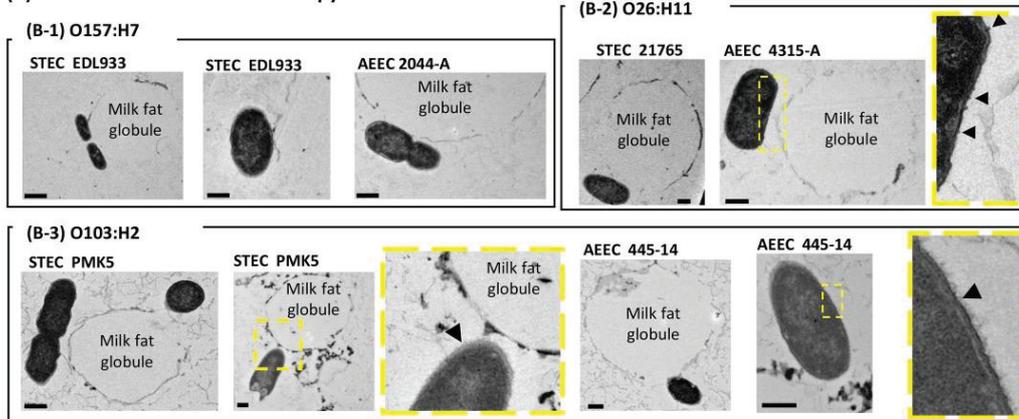
(A) Confocal microscopy**(B) Transmission electron microscopy**

Figure 4. Microscopy observations of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and attaching-effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains in raw milk cream. (A) Confocal laser scanning microscopy observations of O26 AEEC cells specifically labeled with fluorescein-5-isothiocyanate anti-O26 in PBS (A-1) and in the cream obtained by natural creaming from raw milk previously enriched with the O26 AEEC strain at $5 \log_{10}$ cfu/mL (A-2 to A-5). The triglyceride core of MFG appears in red and AEEC cells in green. (B) Transmission electron microscopy (TEM) images of several STEC or AEEC strains in washed cream containing milk fat globules enveloped by their natural biological membrane. In all the TEM images, the scale bars correspond to $0.5 \mu\text{m}$.

strains, were also concentrated in the cream, suggesting that the affinity for raw milk cream is not specific to the STEC pathotype but could be more general to *E. coli*. Moreover, the concentration of STEC in the cream seemed to be fat level dependent (Figure 6).

In this work, we also aimed to quantify the phenomenon of cream saturation by STEC, as suggested in a previous study (Douëllou et al., 2018). The STEC cells were not fully concentrated in the cream at high concentrations ($>7 \log_{10}$ cfu/mL; Figure 1), especially for the O103:H2 and O26:H11 strains. To compare the strains, we estimated the SC by nonlinear regression, defined as the lowest STEC concentration in raw milk for which bacteria were no longer concentrated in the

cream layer. The SC (the concentration threshold in milk) was selected rather than the parameter C_{max} (the maximal concentration of STEC in the cream layer) because raw milk product contamination by STEC is mainly due to milk contamination at the farm level. The parameter C_{max} was also estimated (data not shown), and the conclusions of our study did not change (correlation of both parameters). Furthermore, as C_{milk} was a control parameter in our experiment, this parameter was used as a threshold to establish whether the cream layers were saturated or not (Figure 2). In addition, the volume of cream was always the same, regardless of STEC levels; however, some differences were observed between different milks (Table 2).

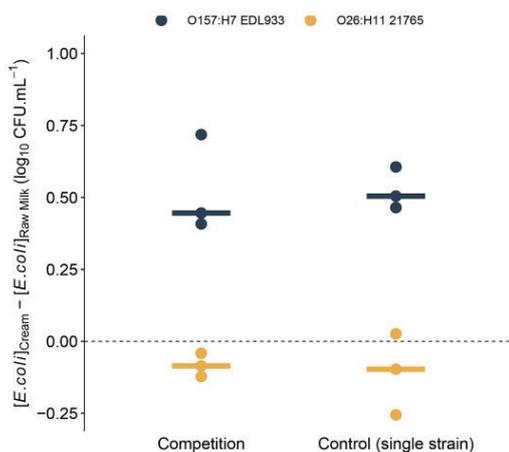


Figure 5. The difference in O157:H7 str. EDL933 (blue) and O26:H11 str. 21765 (yellow) concentration in raw cream compared with the initial concentration in raw milk, obtained by natural creaming assay, either in competition or alone. Raw milk was experimentally spiked at $8 \log_{10}$ cfu/mL with 1 (control) or 2 strains (competition). Bars represent the median of triplicates.

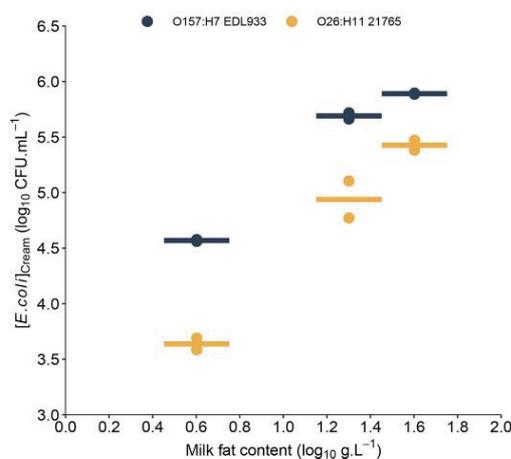


Figure 6. Effect of fat content on the concentration of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cream. Sucrose density gradient centrifugation test was performed on raw milk diluted 2- or 10-fold with UHT skim milk and experimentally spiked at $6 \log_{10}$ cfu/mL with O157:H7 str. EDL933 (blue) or O26:H11 str. 21765 (yellow). Bars represent the mean of duplicates.

Based on SC values, the strains clustered into 3 groups: (1) $\sim 7 \log_{10}$ cfu/mL; (2) $\sim 7.5 \log_{10}$ cfu/mL; and (3) $> 7.8 \log_{10}$ cfu/mL (Figure 2). No correlation, other than serotype or strain, was found that could explain these clusters (e.g., origin, *stx* gene). A genome-wide study including 197 strains showed similar strain clustering based on serotype (Douëllou et al., 2017a). Another study showed the O26:H11 str. 11368 (tested in our study) was in the same cluster as an *E. coli* strain belonging to the O103:H2 serotype (Wyrusch et al., 2015). More *E. coli* strains, especially *eae*-, as well as other enterobacteria, should be assayed to extend and explain these findings.

Our data showed that all *E. coli* O157:H7 strains were located in the same cluster. The estimated SC of O157:H7 strains were between $7.86 \log_{10}$ and $8.21 \log_{10}$ cfu/mL (Figure 2), which was approximately equivalent to the inoculation concentration ($\sim 8 \log_{10}$ cfu/mL). Thus, cream saturation was not fully achieved under the tested conditions for these strains and should probably be higher. In contrast, all strains belonging to the O26:H11 serotype reached saturation. Only one O103:H2 strain (str. PMK5) did not saturate cream in these conditions, whereas the other strains exhibited similar SC at $\sim 7.5 \log_{10}$ cfu/mL (Figure 2). These data are in agreement with previous saturation tests conducted in the laboratory on O26:H11 str. 21765 and O157:H7 str. EDL933 (Douëllou et al., 2018). The behavior of *E. coli*

K-12 str. MG1655 was very similar to the STEC O157 strains, displaying a high saturation point. The SC of O103:H2 str. PMK5, O157:H7 str. 2044-A and str. 1044, and the nonpathogenic *E. coli* str. K-12 MG1655 were not reached in our experimental conditions (Figure 1; Figure 2). These results suggest that the saturation point of these strains is probably higher than the maximum initial concentration of *E. coli* studied in this experiment. For O157:H7 str. EDL933, a wider range of contamination level ($3 \log_{10}$ cfu/mL to $10 \log_{10}$ cfu/mL) was tested by SDG centrifugation assay, and, under these conditions, the cream was saturated at $7.22 \log_{10}$ cfu/mL (Figure 3A).

Furthermore, AEEC strains exhibited SC close to those of STEC strains belonging to the same serotype. Thus, STEC and AEEC seem to have similar affinities for raw milk fat. In addition, all assayed strains displayed a high SC (6.94 to $8.05 \log_{10}$ cfu/mL), compared with the levels observed in products (< 10 cells; (Farrokh et al., 2013)). These data suggest that STEC cells should be mainly found in the cream of naturally contaminated raw milk. However, it is very likely that some cells are still present in the serum phase of the milk. Therefore, further experiments with low STEC contamination levels should be performed.

Confocal microscopy observations of AEEC-contaminated raw milk cream layers showed that MFG could have a pivotal role in the phenomenon of concentra-

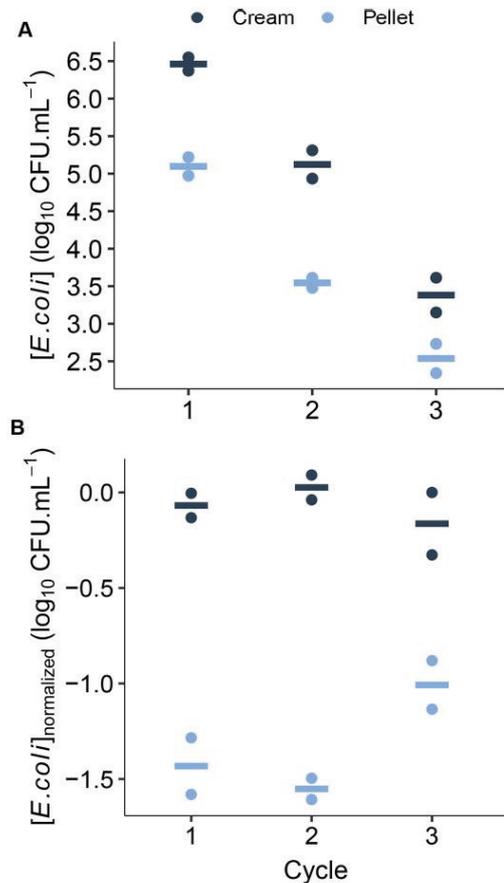


Figure 7. Depletion of O157:H7 str. EDL933 cells pelleted by sucrose density gradient (SDG) centrifugation assay. Raw milk was spiked with O157:H7 str. EDL933 to 6.5 \log_{10} cfu/mL and milk fat globules (MFG) were separated by SDG centrifugation. Pelleted cells were used to inoculate a fresh raw milk sample, and MFG purification was performed again. (A) Concentration of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in cream (dark blue) and pellet (light blue) according to the number of purification cycles. (B) Difference in STEC concentration in both fractions compared with the initial concentration of STEC in raw milk (\log_{10} cfu/mL). Bars represent the mean of duplicates.

tion, as bacterial cells were localized near MFG (Figure 4A). The affinity of bacteria for MFG has been widely demonstrated (Ly et al., 2006; Brisson et al., 2010; Ly-Chatain et al., 2010; D'Incecco et al., 2015; Gomand et al., 2018; Guerin et al., 2018). In this study, our data

confirmed that STEC, as well as AEEC, could associate with MFG.

Based on these observations, we then assessed whether the saturation was due to bacterial spatial congestion rather than to a specific affinity and whether STEC found in the cream were associated with MFG. We also evaluated whether the STEC cells recovered from the milk layer were unable to associate with the cream or MFG.

First, we hypothesized that the presence of additional STEC in the cream is physically not possible, and, as a result, a strain with a high SC can still concentrate in the cream when another strain is already saturating the cream. Competitive natural creaming assays showed that a STEC strain with high cream saturation potential was mainly concentrated in the cream even though the cream was already saturated by a STEC strain with a lower SC (Figure 5). Therefore, the mechanism of STEC concentration in cream may be strain specific.

Second, at low temperatures, MFG rapidly aggregate to form a network (Euber and Brunner, 1984). Some bacterial cells may be trapped in this network and rise with the MFG, to be concentrated in the cream. The SC could, therefore, be overestimated by the natural creaming method. We used the SDG centrifugation test to confirm that STEC recovered in cream were associated with MFG and not simply trapped by them. The results of the SDG centrifugation tests showed the same pattern as natural creaming: STEC concentration in cream at high levels (approx. 6 \log_{10} or 7 \log_{10} cfu/mL, depending on the strain) and a saturation of the cream (Figure 3A). For 2 model strains, STEC-raw milk fat affinity profiles obtained by natural creaming were confirmed by SDG centrifugation assay. These data strongly suggest that the STEC recovered in cream were associated with MFG.

However, the SC determined by SDG centrifugation tests were lower than the SC estimated with the natural creaming method for both strains. We observed approximately 0.96 \log_{10} cfu/mL of difference for the O26 strain and 0.68 \log_{10} cfu/mL difference for the O157 strain (Figure 2; Figure 3B). Furthermore, we found higher variability of the SC with SDG centrifugation tests for both strains, as shown by the larger CI (approximately 1 \log_{10} cfu/mL; Figure 2; Figure 3B). In the SDG assays, the MFG were recovered manually, and a portion of them may have been lost, which could explain both the variability (different quantity recovered per repetition) and the lower estimated SC with this method. In addition, the high sucrose content could affect the STEC-MFG association. However, regardless of the fat separation method, the SC of the O26 strain was always lower than the SC of the O157 strain.

It is important to point out that, although the 2 separation methods provided different SC, these values remain of the same order of magnitude and specific to each strain. The method-specific differences in SC suggest that several mechanisms may be involved in STEC concentration in cream, such as adhesion of STEC to MFGM components, trapping of STEC by MFG, or involvement of other components of raw milk. Ma and Barbano (2000) found that milk with a high bacterial content had a lower fat content (approximately 50–55%) after creaming than milk with a low bacterial content (approximately 80%). In addition, bacteria seem to act as a physical aggregation barrier, and high bacterial content can disturb flocculation and, consequently, raw milk creaming capacity (Dos Santos Morais et al., 2021).

Brewster and Paul (2016) showed that the cream layer exhibits a high containment capacity for *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. Half-saturation for raw milk cream was estimated at approximately $8.5 \log_{10}$ cfu/mL. The same study revealed that the majority of pathogenic bacterial cells added to pasteurized or homogenized milk were recovered in the pellet after simple centrifugation of milk. Heat treatment greatly affects the proteins anchored in the membrane of MFG and disrupts their aggregation capacity, which is intrinsically linked to the creaming phenomenon.

The results of the pellet depletion experiment (Figure 7) showed that pelleted O157:H7 str. EDL933 cells are still able to associate with raw milk fat. The high STEC saturation levels suggest that natural creaming may eliminate a large majority of cells from the raw milk serum phase. We showed that the quantity of O157:H7 str. EDL933 in the pellet fraction after SDG centrifugation tests was still high. We found a difference of approximately $1.5 \log_{10}$ cfu/mL compared with the initial spiked level in raw milk (Figure 7B). In addition, we showed that the pelleted O157:H7 str. EDL933 cells could still be associated with MFG in cream (Figure 7). From the third cycle of purification, the number of bacteria pelleted was lower than previous cycles (Figure 7B), suggesting that more STEC cells are associated with MFG. Several methods of pellet recovery were conducted, to ensure that pellet enumeration was not affected by cream layer residues (data not shown).

Pellets contain bacterial cells (raw milk microbiota and added STEC) and may contain milk proteins that have been weighed down by sucrose (Patton and Huston, 1986). Whey proteins can act as a ligand for STEC-MFG association (Kontopidis et al., 2004). Moreover, raw milk microbiota can interact with STEC or MFG. The SC determined by creaming in this study ($\sim 7 \log_{10}$

to $8 \log_{10}$ cfu/mL; Figure 2; Figure 3B), was 10 to 1,000 times higher than the total mesophilic microflora ($5 \log_{10}$ to $6 \log_{10}$ cfu/mL; Table 3). The presence of intrinsic bacteria associated with raw milk fat is therefore negligible compared with the concentration of STEC required to saturate the cream layer. Nevertheless, the microflora, which can also stick to MFG (Brisson et al., 2010; Guerin et al., 2018; Kosmerl et al., 2021), could decrease the available adhesion surface and therefore modulate the SC. The estimated SC are high compared with the real level of STEC contamination in raw milk. Thus, even though the microflora has an affinity for MFG, in case of contamination with STEC we can predict that the majority of the cells would be concentrated in the cream layer. Moreover, the literature shows that the microflora can affect the viability of some bacterial species, and therefore their detection. *Hafnia alvei* has been shown to inhibit STEC O26:H11 in raw milk cheese (Delbès-Paus et al., 2012). Starter lactic acid bacteria, molds, as well as intrinsic microflora may act as competitors against STEC O157:H7 (Duffy et al., 1999; Rios et al., 2020). Although some evidence suggests that raw milk microbiota may contain antagonistic bacteria against STEC, the saturation phenomenon observed in this study is real, as it was observed in the SDG experiment. Indeed, in this experiment, STEC were not in contact with the potential antagonistic microflora of raw milk long enough to observe an effect. We would also emphasize that the variability of the bacterial counts of the cream layer, between the different milks used, is low, underlining that the effect of the microflora is minimal. Our study was not intended to demonstrate competition between microflora and STEC for MFG. It would be interesting to further study the influence of raw milk microflora on the affinity of STEC for MFG.

The results of our study implicate MFG in the phenomenon of cream saturation and show that, during natural creaming, STEC can be in contact with MFG, probably through specific interactions. The association of STEC with MFG could involve sugars (glycoproteins and glycolipids) anchored in the MFGM (Douëllou et al., 2017b; Guerin et al., 2018; Bagel and Sergentet, 2022). No large bacterial structures were observed in direct contact with the MFGM. Furthermore, no flagella were observed. Nevertheless, for certain strains, some surface structures were observed (Figure 4B). Shiga toxin-producing *E. coli* have a collection of specific adhesins on their surface (McWilliams and Torres, 2014) that recognize sugar moieties of MFGM glycoproteins or glycolipids. Also, somatic cells and immunoglobulins present in raw milk seem to be involved in the concentration of bacteria in the cream layer (Ma and

Barbano, 2000; Caplan et al., 2013; Geer and Barbano, 2014).

From a quality and product safety point of view, our results do not allow us to advise dairy industries on new measures to take. Further studies more specific to current industrial practices are needed. However, our results show that STEC affinity for bovine raw milk or MFG is strain and serotype specific. The underlying mechanism could involve specific interactions between STEC and MFG. The affinity of STEC for MFG and, in particular, the molecular interactions that are involved, need to be further investigated. The identification of molecular targets could lead to new prevention strategies.

CONCLUSIONS

This study demonstrated the affinity of STEC and AEEC strains for raw milk cream and MFG. This affinity was found to be strain and serotype dependent. The results also showed that the affinity and saturation of the cream layer or MFG are not specific to STEC or AEEC strains but may be more generalized to *E. coli*. According to the results of our study, other pathogens or microorganisms could concentrate in the cream layer. Thus, our study could be used as an adhesion or a saturation model for other pathogens, spoilers, and microorganisms in raw milk and the raw milk cream layer. The SC could vary according to the strains. However, STEC were not fully concentrated in the cream layer; therefore a microbiologic hazard remains present in raw milk regardless of the enrichment level, especially for STEC, which has a very low infectious dose. Therefore, natural creaming should not be used as preventive tool to eliminate STEC from bovine raw milk. A more detailed study should be conducted, with industrial creaming practices and STEC spiking conditions closer to field reality, to confirm and extend these conclusions. In addition, the mechanisms of interaction between STEC and dairy product components should be investigated to highlight new tools to control STEC infection and develop therapeutic antiadhesion strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL, French Dairy Interbranch Organization, Paris, France). The French Ministry of Agriculture (Paris, France) and VetAgro Sup (Marcy-L'Etoile, France) also funded part of this work. The authors thank the staff of the French National Reference Laboratory on pathogenic *E. coli* (including STEC; Marcy-L'Etoile, France), Bruno No-

vales for advice concerning the CLSM observations in the BIBS platform (INRAE, Nantes, France), and the CIQLE team (Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France). We also acknowledge E. Jaffres (SECALIM, ONIRIS, Nantes, France) and his team for hosting us in their P2 microbiology laboratory. The authors thank Leah Cannon (Lyon, France) for English-language editing of this manuscript. The authors have not stated any conflicts of interest.

REFERENCES

- ANSES (Agence française de sécurité sanitaire des aliments). 2017. Avis relatif à la détection des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) considérés comme hautement pathogènes en filière hachée bovine. ANSES.
- Anderson, J. F. 1909. The relative proportion of bacteria in top milk (cream layer) and bottom milk (skim milk), and its bearing on infant feeding. *J. Infect. Dis.* 6:392-400. <https://doi.org/10.1093/infdis/6.3.392>.
- Arias-Roth, E., H.-P. Bachmann, M.-T. Fröhlich-Wyder, R. S. Schmidt, D. Wechsler, E. Beuvier, S. Buchin, and C. Delbès. 2022. Raw milk cheeses. Pages 299-308 in *Encyclopedia of Dairy Sciences*, P. L. H. McSweeney and J. P. McNamara, ed. Academic Press.
- Bagel, A., M.-L. Delignette-Muller, C. Lopez, V. Michel, D. Sergentet, and T. Douïllou. 2022. Strain- and serotype-dependent affinity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* for bovine milk fat globules - Supplementary data. OSF. <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/K86TA>.
- Bagel, A., and D. Sergentet. 2022. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and milk fat globules. *Microorganisms* 10:496. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030496>.
- Baschali, A., E. Tsakalidou, A. Kyriacou, N. Karavasiloglou, and A.-L. Matalas. 2017. Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: A neglected food group. *Nutr. Res. Rev.* 30:1-24. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000202>.
- Baylis, C. L. 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Int. J. Dairy Technol.* 62:293-307. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00504.x>.
- Bird, J. 1991. Cream separation. *Int. J. Dairy Technol.* 44:61-63. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1991.tb00638.x>.
- Brewster, J. D., and M. Paul. 2016. Short communication: Improved method for centrifugal recovery of bacteria from raw milk applied to sensitive real-time quantitative PCR detection of *Salmonella* spp. *J. Dairy Sci.* 99:3375-3379. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9655>.
- Brisson, G., H. F. Payken, J. P. Sharpe, and R. Jiménez-Flores. 2010. Characterization of *Lactobacillus reuteri* interaction with milk fat globule membrane components in dairy products. *J. Agric. Food Chem.* 58:5612-5619. <https://doi.org/10.1021/jf904381s>.
- Caplan, Z., C. Melilli, and D. M. Barbano. 2013. Gravity separation of fat, somatic cells, and bacteria in raw and pasteurized milks. *J. Dairy Sci.* 96:2011-2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6006>.
- Claeys, W. L., S. Cardoen, G. Daube, J. De Block, K. Dewettinck, K. Dierick, L. De Zutter, A. Huyghebaert, H. Imberechts, P. Thiange, Y. Vandenplas, and L. Herman. 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* 31:251-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.035>.
- Currie, A., E. Galanis, P. A. Chacon, R. Murray, L. Wilcott, P. Kirkby, L. Honish, K. Franklin, J. Farber, R. Parker, S. Shyng, D. Sharma, L. Tschetter, L. Hoang, L. Chui, A. Pacagnella, J. Wong, J. Pritchard, A. Kerr, M. Taylor, V. Mah, and J. Flint. 2018. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to aged raw milk Gouda cheese. *J. Food Prot.* 81:325-331. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-283>.

- D'Incecco, P., F. Faoro, T. Silveti, K. Schrader, and L. Pellegrino. 2015. Mechanisms of *Clostridium tyrobutyricum* removal through natural creaming of milk: A microscopy study. *J. Dairy Sci.* 98:5164–5172. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9526>.
- Delbès-Paus, C., S. Pochet, S. Helinck, P. Veisseire, C. Bord, A. Lebecque, M. Coton, N. Desmasures, E. Coton, F. Irlinger, and M.-C. Montel. 2012. Impact of Gram-negative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese. *Food Microbiol.* 30:74–82. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.008>.
- Dewettinck, K., R. Rombaut, N. Thienpont, T. T. Le, K. Messens, and J. Van Camp. 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* 18:436–457. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.014>.
- Dos Santos Morais, R., N. Louvet, F. Borges, D. Dumas, L. Cvetkovska-Ben Mohamed, S. Barrau, J. Scher, C. Gaiani, and J. Burgain. 2021. Impact of *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG on the emulsion stability of raw milk. *Foods* 10:991. <https://doi.org/10.3390/foods10050991>.
- Douéllou, T., S. Delannoy, S. Ganet, P. Fach, E. Loukiadis, M. C. Montel, and D. Sergentet-Thevenot. 2017a. Molecular characterization of O157:H7, O26:H11 and O103:H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 253:59–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.010>.
- Douéllou, T., W. Galia, S. Kerangart, T. Marchal, N. Milhau, R. Bastien, M. Bouvier, S. Buff, M.-C. Montel, and D. Sergentet-Thevenot. 2018. Milk fat globules hamper adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to enterocytes: In vitro and in vivo evidence. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00947>.
- Douéllou, T., M. C. Montel, and D. Thevenot Sergentet. 2017b. Invited review: Anti-adhesive properties of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane-associated glycoconjugates against bacterial food enteropathogens. *J. Dairy Sci.* 100:3348–3359. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11611>.
- Duffy, G., R. C. Whiting, and J. J. Sheridan. 1999. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 16:299–307. <https://doi.org/10.1006/fmic.1998.0242>.
- EFSA BIOHAZ Panel. 2015. Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA J.* 13:3940. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3940>.
- Espié, E., V. Vaillant, P. Mariani-Kurkdjian, F. Grimont, R. Martin-Schaller, H. De Valk, and C. Vernozy-Rozand. 2006. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with fresh unpasteurized goat's cheese. *Epidemiol. Infect.* 134:143–146. <https://doi.org/10.1017/S0950268805004887>.
- Euber, J. R., and J. R. Brunner. 1984. Reexamination of fat globule clustering and creaming in cow milk. *J. Dairy Sci.* 67:2821–2832. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81642-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81642-2).
- Evers, J. M., R. G. Haverkamp, S. E. Holroyd, G. B. Jameson, D. D. S. Mackenzie, and O. J. McCarthy. 2008. Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques. *Int. Dairy J.* 18:1081–1089. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.06.001>.
- FAO/WHO. 2019. Attributing illness caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) to specific foods. FAO.
- FAO/WHO. 2021. Proposed draft guidelines for the control of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in raw beef, fresh leafy vegetables, raw milk and raw-milk cheeses, and sprouts. Electronic Working Group co-chaired by Chile, France, New Zealand and the United States of America. Codex Alimentarius Commission, CX/FH 22/52/7. FAO/WHO.
- Farrokhi, C., K. Jordan, F. Auvray, K. Glass, H. Oppegaard, S. Raynaud, D. Thevenot, R. Condron, K. De Reu, A. Govaris, K. Heggun, M. Heyndrickx, J. Hummerjohann, D. Lindsay, S. Miszczyska, S. Moussiégt, K. Verstraete, and O. Cerf. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.* 162:190–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>.
- Galia, W., P. Mariani-Kurkdjian, E. Loukiadis, S. Blanquet-Diot, F. Leriche, H. Brugère, A. Shima, E. Oswald, B. Cournoyer, and D. Thevenot-Sergentet. 2015. Genome sequence and annotation of a human infection isolate of *Escherichia coli* O26:H11 involved in a raw milk cheese outbreak. *Genome Announc.* 3:e01568-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01568-14>.
- Gaucheron, F. 2005. The minerals of milk. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:473–483. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005030>.
- Geer, S. R., and D. M. Barbano. 2014. The effect of immunoglobulins and somatic cells on the gravity separation of fat, bacteria, and spores in pasteurized whole milk. *J. Dairy Sci.* 97:2027–2038. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7629>.
- Gomand, F., F. Borges, D. Salim, J. Burgain, J. Guerin, and C. Gaiani. 2018. High-throughput screening approach to evaluate the adhesive properties of bacteria to milk biomolecules. *Food Hydrocoll.* 84:537–544. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.038>.
- Guerin, J., C. Soligot, J. Burgain, M. Huguet, G. Francius, S. El-Kirat-Chatel, F. Gomand, S. Lebeer, Y. Le Roux, F. Borges, J. Scher, and C. Gaiani. 2018. Adhesive interactions between milk fat globule membrane and *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit bacterial attachment to Caco-2 TC7 intestinal cell. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 167:44–53. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.044>.
- Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M. Hattori, and H. Shinagawa. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 8:11–22.
- Honish, L., G. Predy, N. Hislop, L. Chui, K. Kowalewska-Grochowska, L. Trotter, C. Kreplin, and I. Zazulak. 2005. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Can. J. Public Health* 96:182–184. <https://doi.org/10.1007/BF03403686>.
- International Dairy Federation (IDF). 2016. Raw milk cheeses – IDF Factsheet.
- Jost, R. 2007. Milk and dairy products. Pages 315–375 in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. https://doi.org/10.1002/14356007.a16_589.pub3.
- Keenan, T. W., and I. H. Mather. 2006. Intracellular origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane. Pages 137–171 in *Advanced Dairy Chemistry Volume 2: Lipids*. 3rd ed. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, ed. Springer US.
- Kontopidis, G., C. Holt, and L. Sawyer. 2004. Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding properties, structure, and function. *J. Dairy Sci.* 87:785–796. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73222-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1).
- Kosmerl, E., D. Rocha-Mendoza, J. Ortega-Anaya, R. Jiménez-Flores, and I. García-Cano. 2021. Improving human health with milk fat globule membrane, lactic acid bacteria, and bifidobacteria. *Microorganisms* 9:341. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020341>.
- Lamson, R. W. 1918. A comparison of bacteria counts in whole and skim milk, separator and centrifuge cream. *J. Dairy Sci.* 1:498–507. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(18\)94395-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(18)94395-X).
- Lopez, C. 2020. Intracellular origin of milk fat globules, composition and structure of the milk fat globule membrane highlighting the specific role of sphingomyelin. Pages 107–131 in *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*. 4th ed. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, and J. A. O'Mahony, ed. Springer Cham.
- Ly, M. H., N. H. Vo, T. M. Le, J.-M. Belin, and Y. Waché. 2006. Diversity of the surface properties of *Lactococci* and consequences on adhesion to food components. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 52:149–153. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.04.015>.
- Ly-Chatain, M. H., M. L. Le, M. L. Thanh, J.-M. Belin, and Y. Waché. 2010. Cell surface properties affect colonisation of raw milk by lactic acid bacteria at the microstructure level. *Food Res. Int.* 43:1594–1602. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.019>.

- Ma, Y., and D. M. Barbano. 2000. Gravity separation of raw bovine milk: Fat globule size distribution and fat content of milk fractions. *J. Dairy Sci.* 83:1719–1727. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75941-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75941-7).
- Mariani-Kurkdjian, P., E. Denamur, A. Milon, B. Picard, H. Cave, N. Lambert-Zechovsky, C. Loirat, P. Goulet, P. J. Sansonetti, and J. Elion. 1993. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J. Clin. Microbiol.* 31:296–301. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.2.296-301.1993>.
- McWilliams, B.D., and A.G. Torres. 2014. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* adhesins. *Microbiol. Spectr.* 2:2.3.10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013>.
- Mulder, H., and P. Walstra. 1974. The milk fat globule: Emulsion science as applied to milk products and comparable foods (Technical communication of the Commonwealth Bureau of Dairy Science and Technology). Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal, and Centre for Agricultural Publishing and Documentation.
- Mungai, E. A., C. Behravesh, and L. Gould. 2015. Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007–2012. *Emerg. Infect. Dis.* 21:119–122. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140447>.
- Nian, Y., B. Y. Chen, P. Aikman, A. Grandison, and M. Lewis. 2012. Naturally occurring variations in milk pH and ionic calcium and their effects on some properties and processing characteristics of milk. *Int. J. Dairy Technol.* 65:490–497. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00861.x>.
- Ofek, I., D. L. Hasty, and N. Sharon. 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: Prospects and problems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38:181–191. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00228-1](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00228-1).
- Ogura, Y., T. Ooka, J. Asadulghani, J. Terajima, J.-P. Nougayrède, K. Kurokawa, K. Tashiro, T. Tobe, K. Nakayama, S. Kuhara, E. Oswald, H. Watanabe, and T. Hayashi. 2007. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biol.* 8:R138. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r138>.
- Patton, S., and G. E. Huston. 1986. A method for isolation of milk fat globules. *Lipids* 21:170–174. <https://doi.org/10.1007/BF02534441>.
- Perna, N. T., G. Plunkett III, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Pósfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, and F. R. Blattner. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529–533. <https://doi.org/10.1038/35054089>.
- Perrin, F., F. Tenenhaus-Aziza, V. Michel, S. Miszczycha, N. Bel, and M. Sanaa. 2015. Quantitative risk assessment of haemolytic and uremic syndrome linked to O157:H7 and non-O157:H7 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains in raw milk soft cheeses. *Risk Anal.* 35:109–128. <https://doi.org/10.1111/risa.12267>.
- Quigley, L., O. O'Sullivan, C. Stanton, T. P. Beresford, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and P. D. Cotter. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37:664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.
- R Core Team. 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Reinhardt, T. A., and J. D. Lippolis. 2006. Bovine milk fat globule membrane proteome. *J. Dairy Res.* 73:406–416. <https://doi.org/10.1017/S0022029906001889>.
- Rios, E. A., J. Ramos-Pereira, J. A. Santos, T. M. López-Díaz, A. Otero, and J. M. Rodríguez-Calleja. 2020. Behaviour of non-O157 STEC and atypical EPEC during the manufacturing and ripening of raw milk cheese. *Foods* 9:1215. <https://doi.org/10.3390/foods9091215>.
- Silanikove, N., G. Leitner, and U. Merin. 2015. The interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: Global perspectives in evolutionary and historical backgrounds. *Nutrients* 7:7312–7331. <https://doi.org/10.3390/nu7095340>.
- Soni, S., and G. Dey. 2014. Perspectives on global fermented foods. *Br. Food J.* 116:1767–1787. <https://doi.org/10.1108/BFJ-01-2014-0032>.
- Spitsberg, V. L. 2005. Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *J. Dairy Sci.* 88:2289–2294. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72906-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72906-4).
- Treacy, J., C. Jenkins, K. Paranthaman, F. Jorgensen, D. Mueller-Dobies, M. Anjum, L. Kaindama, H. Hartman, M. Kirchner, T. Carson, and I. Kar-Purkayastha. 2019. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 linked to raw drinking milk resolved by rapid application of advanced pathogen characterization methods. *Euro Surveill.* 24:1800191. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.16.1800191>.
- Wilson, N. L., L. J. Robinson, A. Donnet, L. Bovetto, N. H. Packer, and N. G. Karlsson. 2008. Glycoproteomics of milk: Differences in sugar epitopes on human and bovine milk fat globule membranes. *J. Proteome Res.* 7:3687–3696. <https://doi.org/10.1021/pr700793k>.
- Wyrsch, E., P. R. Chowdhury, S. Abraham, J. Santos, A. E. Darling, I. G. Charles, T. A. Chapman, and S. P. Djordjevic. 2015. Comparative genomic analysis of a multiple antimicrobial resistant enterotoxigenic *E. coli* O157 lineage from Australian pigs. *BMC Genomics* 16:165. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1382-y>.
- Yoon, Y., S. Lee, and K.-H. Choi. 2016. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control* 63:201–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>.

Chapitre 5

**Interactions aspécifiques et
spécifiques entre les STEC et
les globules gras du lait cru**

Article de recherche n°2

Bagel, A. *et al.*, 2022, Serotype-dependent adhesion of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to bovine milk fat globule membrane proteins. *Frontiers in Microbiology*. 13.

Par soucis de visualisation et de place, les tableaux en données supplémentaires n'ont pas été intégrés au manuscrit.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Min Yue,
Zhejiang University,
China

REVIEWED BY
Gabriel Augusto Marques Rossi,
Vila Velha University, Brazil
Marcello Trevisani,
University of Bologna,
Italy

*CORRESPONDENCE
Delphine Sergentet
delphine.sergentet@vetagro-sup.fr

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

RECEIVED 03 August 2022
ACCEPTED 10 October 2022
PUBLISHED 24 November 2022

CITATION
Bagel A, Lopez C, David-Briand E, Michel V,
Douëllou T and Sergentet D (2022)
Serotype-dependent adhesion of Shiga
toxin-producing *Escherichia coli* to bovine
milk fat globule membrane proteins.
Front. Microbiol. 13:1010665.
doi: 10.3389/fmicb.2022.1010665

COPYRIGHT
© 2022 Bagel, Lopez, David-Briand, Michel,
Douëllou and Sergentet. This is an open-
access article distributed under the terms
of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Serotype-dependent adhesion of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to bovine milk fat globule membrane proteins

Arthur Bagel¹, Christelle Lopez², Elisabeth David-Briand²,
Valérie Michel³, Thomas Douëllou¹ and Delphine Sergentet^{1,4*}

¹Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment Research Group, UMR5557 Ecologie Microbienne Lyon, National Center of Scientific Research (CNRS), Université de Lyon, Marcy-l'Etoile, France, ²INRAE, UR BIA, Nantes, France, ³Actalia, La Roche-sur-Foron, France, ⁴Laboratoire d'Etudes des Microorganismes Alimentaires Pathogènes, VetAgro Sup—Campus Vétérinaire, French National Reference Laboratory for *Escherichia coli* Including Shiga Toxin-Producing *E. coli* (NRL-STECC), Université de Lyon, Marcy-l'Etoile, France

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are food-borne pathogens that can cause severe symptoms for humans. Raw milk products are often incriminated as vehicle for human STEC infection. However, raw milk naturally contains molecules, such as the milk fat globule membrane and associated proteins, that could inhibit pathogen adhesion by acting as mimetic ligands. This study aimed to: (i) evaluate the capability of STEC cells to adhere to bovine milk fat globule membrane proteins (MFGMPs), (ii) highlight STEC surface proteins associated with adhesion and (iii) evaluate the variation between different STEC serotypes. We evaluated the physicochemical interactions between STEC and milk fat globules (MFGs) by analyzing hydrophobic properties and measuring the ζ -potential. We used a plate adhesion assay to assess adhesion between MFGMPs and 15 *Escherichia coli* strains belonging to three key serotypes (O157:H7, O26:H11, and O103:H2). A relative quantitative proteomic approach was conducted by mass spectrometry to identify STEC surface proteins that may be involved in STEC-MFG adhesion. The majority of *E. coli* strains showed a hydrophilic profile. The ζ -potential values were between -3.7 and -2.9 mV for the strains and between -12.2 ± 0.14 mV for MFGs. Our results suggest that non-specific interactions are not strongly involved in STEC-MFG association and that molecular bonds could form between STEC and MFGs. Plate adhesion assays showed a weak adhesion of O157:H7 *E. coli* strains to MFGMPs. In contrast, O26:H11 and O103:H2 serotypes attached more to MFGMPs. Relative quantitative proteomic analysis showed that the O26:H11 str. 21,765 differentially expressed five outer membrane-associated proteins or lipoproteins compared with the O157:H7 str. EDL933. This analysis also found strain-specific differentially expressed proteins, including four O26:H11 str. 21,765-specific proteins/lipoproteins and eight O103:H2 str. PMK5-specific proteins. For the first time, we demonstrated STEC adhesion to MFGMPs and discovered a serotype effect. Several outer membrane proteins—OmpC and homologous proteins, intimin, Type 1 Fimbriae, and AIDA-I—that may be involved in STEC-MFG adhesion were highlighted. More research on STEC's ability to adhere to MFGMs in diverse biological environments, such as

raw milk cheeses and the human gastrointestinal tract, is needed to confirm the anti-adhesion properties of the STEC-MFG complex.

KEYWORDS

food-borne pathogen bacteria, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, outer membrane proteins, raw milk, milk fat globule membrane, bacterial adhesion, food safety, anti-adhesion therapy

Introduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are food-borne pathogens whose source is most often the digestive tract of ruminants. Ingestion of ruminant-derived raw products, such as uncooked meat or raw milk dairy products, contaminated with STEC may result in a human infection. Water and vegetation soiled by ruminant feces are also incriminated as vehicle for human STEC infection (Kim et al., 2020). The Shiga toxins in STEC may cause mild symptoms or more severe conditions such as hemorrhagic colitis and hemolytic and uremic syndrome (HUS). STEC was the fourth most common zoonotic infection in the EU in 2020, after campylobacteriosis, salmonellosis, and yersiniosis (EFSA and ECDC, 2021). According to the latest WHO and FAO report, almost 2.5 million STEC cases occurred worldwide in 2010, resulting in 3,330 HUS cases, 200 cases of end-stage renal disease (ESRD), 27,000 Disability-Adjusted Life Years (DALY), and 269 deaths (FAO and WHO, 2018). Foodborne diseases are believed to account for half of the STEC disease burden.

These data suggest that both the risk of major sequelae after STEC infection and the case-fatality ratio are low, resulting in a modest illness burden at the population level. This, however, ignores the considerable cost placed on individual patients and their families, as well as the economic and trade implications of this food-borne pathogen. More than 470 STEC serotypes have been identified and almost 130 of these are associated with human health consequences (Zhang et al., 2022). The most common STEC serotype linked to foodborne outbreaks and human illnesses is STEC O157:H7. Other non-O157:H7 STEC serotypes have been a major source of foodborne outbreaks and sporadic infections in recent years (Valilis et al., 2018; The Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment (JEMRA), 2019). STEC O26:H11 and O103:H2 serotypes are most commonly linked to raw dairy product-mediated STEC infection (Doullou et al., 2016).

The ability to adhere to the intestinal epithelium and colonize the intestine undeniably contributes to the pathogenicity of STEC cells. A vast majority of the STEC clinical isolates known to cause bloody diarrhea or HUS have one or more virulence factors that allow their adhesion to intestinal epithelial cells (FAO and WHO, 2018). The major adhesion factor of clinical STEC isolates is intimin, a protein encoded by the *eae* gene that resides in the locus of an enterocyte effacement

pathogenicity island (LEE) (The Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment (JEMRA), 2019). To effectively colonize a host and cause disease, STEC has evolved mechanisms and strategies for attaching and adhering to host cells and tissues (Koutsoumanis et al., 2020). Adhesion prevents STEC cells from being swept away by the host's natural self-cleaning mechanisms and, therefore, allows colonization and growth at a host-specific site (The Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment (JEMRA), 2019). Thus, adhesion is a key step in the bacterial pathogenic mechanism, and inhibiting this early step may prevent infection.

Bacterial adhesion is a complex mechanism involving a non-specific and a specific phase. Non-specific interactions are the consequence of attractive and repulsive forces between the bacterium and the surface, allowing their rapprochement. These forces include all non-covalent interactions such as electrostatic interactions or surface charges, Van der Waals and Lewis acid/base interactions, as well as hydrophobic interactions (van Loosdrecht et al., 1987; Zita and Hermansson, 1997). Hydrophobic interactions and surface charges are the primary forces influencing bacterial adhesion (Berne et al., 2018). Hydrophobic interactions are defined as the ability of two components of similar hydrophobicity to attract each other (Krasowska and Sigler, 2014). Electrostatic forces result from the presence of a double ionic layer at the surface of a particle. If two membranes have opposing charges, they repel each other and, therefore, prevent progression to the second phase. The second bacterial adhesion phase, called the "specific phase," involves molecular factors exposed on both target and bacterial cell surfaces. Adhesins are bacterial adhesion molecules that recognize oligosaccharide moieties or peptide residues on target cell surfaces. Porins, complex protein structures such as pili or flagella, glycoproteins, and glycolipids are all examples of adhesins.

Foods contain various ligands that could inhibit or limit pathogen adhesion to the intestinal epithelium. Raw milk contains free or protein-associated carbohydrates that could act as mimetic ligands for pathogens (Doullou et al., 2017; Sun and Wu, 2017). Interestingly, the prevalence of STEC in raw milk products is high compared with the number of human infection cases, suggesting that the raw milk matrix can modulate the pathogenicity of STEC (Farrokh et al., 2013; Bagel and Sergentet, 2022). Full-fat raw milk cheeses can impair STEC adhesion to

TABLE 1 Collection of 16 *E. coli* strains used in the study, included O157 and non-O157 strains: O157:H7 ($n=5$), O26:H11 ($n=5$), O103:H2 ($n=5$), and the non-pathogenic *E. coli* K-12 str. MG1655.

Strain	Intimin and Shiga-toxin genotype	Origin	Detailed origin	Isolation date	Reference
Serotype O157:H7					
SAKAI	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Human	HUS	1996	Hayashi et al. (2001)
EDL933	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Human	HUS	1983	Perna et al. (2001)
1044	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2012	a
5280-B	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2019	a
2044-A	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2016	a
Serotype O26:H11					
21765	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Human	HUS	2005	Galia et al. (2015)
11368	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Human	HUS	2001	Ogura et al. (2007)
103	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Dairy product	HUS	2012	a
2157-A	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2018	a
4315-A	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2019	a
Serotype O103:H2					
PMK5	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Human	HUS	1993	Mariani-Kurkdjian et al. (1993)
32396	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Human	HUS	2011	b
1487-A	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2018	a
2503	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2012	a
445-14	eae ⁺ stx1 ⁺ stx2 ⁺	Dairy product	Bovine raw milk cheese	2012	a
MG1655 K12	eae ⁻ stx1 ⁻ stx2 ⁻	Human	Stool sample	1922	Bachmann (1996)

We paid close attention to the strains' origin and virulence genes. For each sub-serotype, we retained two strains isolated from human cases and three others from cheese made from cow's raw milk. In addition, we chose strains based on whether stx1 and/or stx2 genes were present ($n=4$) or not ($n=1$). HUS, hemolytic and uremic syndrome.

a, French National STEC Reference Laboratory (VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France).

b, Mother and Child Hospital (Hospices Civils de Lyon, Bron, France).

This *E. coli* strain collection was used in a previous study (Bagel et al., 2022).

mouse enterocytes, while low-fat raw milk cheeses cannot (Douëllou et al., 2018). Furthermore, STEC can associate with milk fat globules (MFGs) in bovine raw milk and this affinity is serotype- and strain-dependent (Bagel et al., 2022). However, the underlying mechanisms of the STEC-MFG association remain unknown.

Milk fat globules are lipid droplets naturally secreted into milk by mammary epithelial cells (Lopez, 2020a) and comprise almost 98% of total raw milk fat (Lee et al., 2018). MFGs are composed of a triglyceride core surrounded by a biological membrane, called the milk fat globule membrane (MFGM), that is structured as a trilayer of polar lipids (phospholipids, sphingolipids, cholesterol) and membrane-specific proteins (glycoproteins, enzymes) (Lopez, 2020b). A rich diversity of proteins and glycoproteins, called the MFGM proteins (MFGMPs), as well as glycolipids, are anchored in the outer layer of the MFGM and could act as ligands for bacteria or viruses (Spitsberg, 2005; Douëllou et al., 2017). Interestingly, some MFGMPs have similarities with (glyco)-proteins of human intestinal cells, especially mucins that play a pivotal role in enterobacterial adhesion (Bagel and Sergentet, 2022).

In this study, we hypothesized that STEC could adhere to MFGs through molecular interactions between STEC and MFGMPs. The study aimed to evaluate the impact of serotype on

STEC's ability to adhere to bovine MFGMPs and to elucidate which STEC surface proteins are associated with an adhesion profile.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

Details of *E. coli* strains used in the following experiments are listed in Table 1. Bacteria were plated from glycerin-BHI frozen stock (-80°C) onto Luria-Bertani agar (LB) plates (Oxoid, Thermo Fisher Diagnostics, Dardilly, France) and incubated for 24 h at 37°C . The day before the experiments, one colony was picked from the agar plate and cultured overnight at 37°C in Brain heart infusion (BHI) (BioMérieux, Marcy-1'Etoile, France). This procedure was performed for each experiment described below. The term "*E. coli*" refers to the entire collection.

Solutions and products

Phosphate buffer (PB) was composed of NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 at 19.0 mmol.L^{-1} and 23.9 mmol.L^{-1} , respectively, at $\text{pH}=6.8$ and ionic strength = 80 mM . The washing/blocking buffer

(WBB) was obtained by adding 5% Tween 20 to PB. The coating buffer (CB) was composed of Tris 63 mmol.L⁻¹, 2% SDS, 4% β-mercaptoethanol, and 20% glycerol. The pH was adjusted to 6.8 with a hydrochloric acid solution. All products were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Raw milk, milk fat globules, and milk fat globule membrane proteins

Raw whole bovine milks were collected after the morning milking (7 a.m.) and provided by Gaec des Fougères (35 La Chapelle des Fougeretz, France).

MFGs were isolated from the milk aqueous phase to remove proteins (caseins, whey proteins) using a method adapted from [The Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment \(JEMRA\) \(2019\)](#). Briefly, (i) the milk was warmed to 50°C for 10 min; (ii) 15 mL of raw whole milk were deposited, using a syringe, at the bottom of 50 mL plastic centrifuge tubes containing 30 mL of ultrafiltration milk permeate (UFMP; aqueous phase of milk with proteins and lipids removed), (iii) the tubes were centrifuged at 1600g for 20 min in order to form a layer of washed MFGs at the top of the tubes that was collected for further investigations.

MFGMPs were obtained using a method developed in the INRAE lab: (i) raw whole bovine milks (4%wt fat) were centrifuged using a disc stack centrifuge (Elecrem) to obtain a cream (approximately 40%wt fat), (ii) the cream was dispersed in warmed water to reach 4%wt fat and centrifuged to remove the proteins (caseins, whey proteins), lactose and minerals (step repeated twice); (iii) the cream containing washed MFGs was stored at -20°C until further use; (iv) the cream was churned at 8°C using a household mixer (Kenwood) at speed 5 for 30 min; (v) the aqueous phase, called buttermilk and enriched in MFGM fragments, was obtained, filtered, and centrifuged at 12,000g for 30 min; (vi) to remove the lipids, the MFGM-enriched pellet was treated with a mixture of ether/ethanol (1/3, v/v), shaken, stored one night at 20°C, and centrifuged at 1,200g for 10 min at 10°C; (vii) the pellet was washed twice using the ether/ethanol mixture; (viii) the recovered MFGM proteins were dried using nitrogen and stored at 4°C in ethanol until further utilization, (ix) SDS-PAGE confirmed the removing of milk proteins (caseins, whey proteins) and the presence of MFGMPs in the extract.

Evaluation of the non-specific interactions between STEC and MFGs

Escherichia coli cell surface hydrophobicity

Cell surface hydrophobicity (CSH) of STEC strains was evaluated through the microbial adhesion to hydrocarbon (MATH) test ([Rosenberg et al., 1980](#)). For each strain, three independent stationary bacterial cultures were washed once in PB and calibrated at 5.10⁸ CFU.mL⁻¹ in the same buffer. Then 300 μL of n-hexadecane (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific,

Lissieux, France) were added to 3 ml of bacterial suspension in a round bottom glass tube (1:10). Glass tubes were carefully placed in a densitometer (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) to measure the initial bacterial turbidity (McF₀). Then, glass tubes were vortexed for 2 min at maximal speed and set aside for 20 min to allow phase separation. The final turbidity (McF₂₀) was measured as previously described. Cell surface hydrophobicity (CSH) was defined as the percentage of *E. coli* present in the hydrocarbon phase at the end of the experiment and was calculated by the following formula:

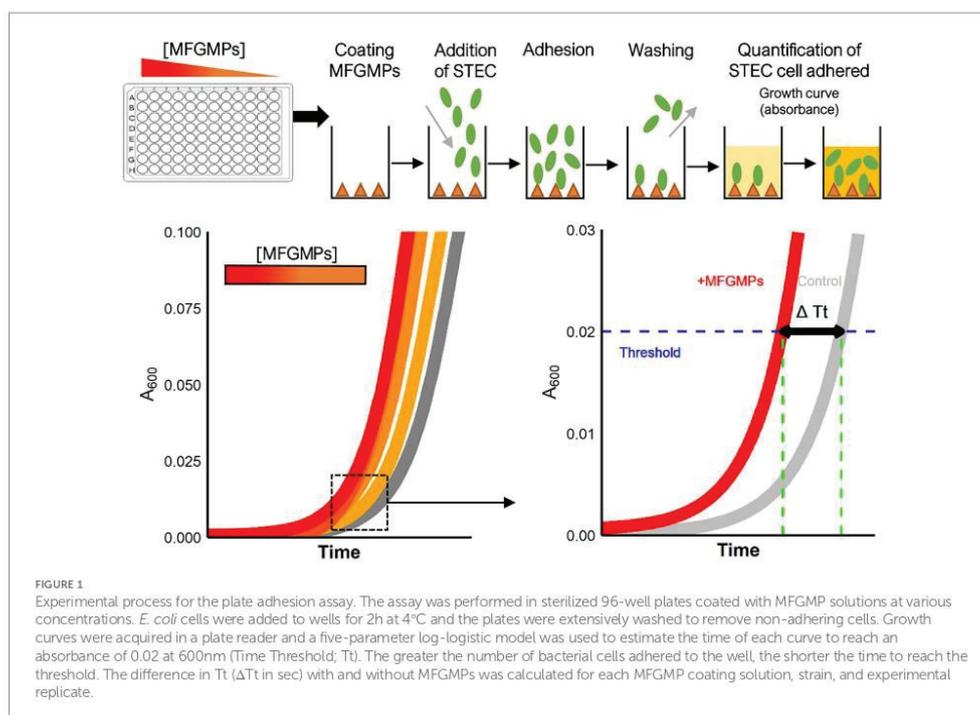
$$CSH (\%) = 100 \times \frac{McF_0 - McF_{20}}{McF_0}$$

Escherichia coli surface charge: ζ-potential measurements

The ζ-potential values of MFGs and AEEC strains were determined. An overnight bacterial culture (BHI; 37°C) of each AEEC strain, belonging to the three *E. coli* serotypes studied, was washed and calibrated at 9 log₁₀ CFU.mL⁻¹ in UFMP. The bacterial concentration was set according to the number of MFGs in raw milk, which is close to 9 log₁₀ MFGs/mL of raw milk. Samples were then prepared by suspending 5–10 μL of raw whole bovine milk, washed MFGs, or calibrated bacterial cultures in 10 mL of UFMP to have the same pH and ionic strength as milk. The samples were added to a cuvette (1 mL), which was then placed into the chamber of a Zetasizer Nano ZS (Malvern, Germany). The ζ-potential was calculated from the electrophoretic mobility according to the Smoluchowski approximation and Henry's law. The measurements were run five times at 25°C.

Evaluation of the capacity of *Escherichia coli* to adhere to MFGMPs

A plate adhesion assay was performed to evaluate the capacity of *E. coli* to adhere to MFGMPs. [Figure 1](#) shows the main steps of the experiment. Dried-MFGM proteins were resuspended in coating buffer (CB), filtered at 0.22 μm with cellulose acetate microfiltration tubes (Clearspin), aliquoted, and stored at -80°C. For each assay, an aliquot of MFGMPs was thawed and four-fold dilutions were performed in CB. A 96-well plate (Nunc MaxiSorp plate, ThermoFisher, Dardilly) was UV-sterilized for 30 min and wells were coated overnight at 20 ± 1°C with 100 μL of MFGMP solution at 100, 25, 6.25, 1.56, or 0.39 μg.mL⁻¹. Wells were also coated with MFGMP-free coating buffer as a control (basal level of adhesion). Coating solutions were removed and wells were washed three times with 250 μL of washing/blocking buffer. Wells were then blocked for 2 h at 20 ± 1°C with 250 μL of washing/blocking buffer. For each strain assayed, an overnight bacterial culture in stationary phase (BHI; 37°C) was washed in PB, calibrated at 8 log₁₀ CFU.mL⁻¹ (according to the OD_{600nm}/CFU.



mL⁻¹ relation), and stored at 4°C for 2 h before being added to wells. The blocking buffer was removed and replaced with 100 μ L of bacterial solution. The adhesion assays were performed at 4°C for 2 h in static conditions. Wells were washed five times with 250 μ L of washing/blocking buffer to remove non-adherent bacteria. Wells were air-dried (5–10 min) to remove any traces of buffer. Washing and blocking steps were realized with Wellwash™ Microplate Washer (ThermoFisher). The number of adherent *E. coli* cells was estimated by the delay of growth. Bacterial growth was initiated by adding 100 μ L of LB medium to each well. Plates were incubated in a plate reader (Spark, Tecan, Tecan France, Lyon) inside a large humidity cassette at 37°C. The absorbance at 600 nm was measured every 15 min, after a shaking step (15 s at 200 rpm), for 15 h. The number of adherent *E. coli* cells was estimated by the delay of the bacterial lag phase which is proportional to the number of bacterial cells (Hazan et al., 2012). This process was performed three times for each strain with independent bacterial overnight cultures. To limit plate edge effects, edge wells were not used.

For each growth curve, a five-parameter log-logistic fit was used to estimate the time (in seconds) to reach a 0.02 absorbance threshold (Tt; Time Threshold) as previously described (Hoffmann et al., 2018). The “R” (R Core Team, 2021) script provided by the authors was used and slightly adapted to our design plan.

Subsequently, for each condition, we calculated the difference in Tt with and without MFGMPs (ΔTt) for each 96-well plate. An increase in adherent bacterial cells in a well was shown by $\Delta Tt > 0$ s, while a $\Delta Tt < 0$ s meant a loss of bacterial cells. The results of this experiment were expressed as the median of ΔTt from three independent repetitions and the standard deviation in seconds (median \pm standard deviation). The linearity between the response variable (ΔTt in sec) and the explanatory variable (concentration of MFGMPs in μ g.mL⁻¹) after log₁₀ transformation was evaluated by simple linear regression, according to serotype. For these calculations, “R” software and the “stats” package (R Core Team, 2021) were used. The independence, normal distribution, and homogeneity of the residuals of each linear regression were checked graphically and complementary statistical tests were used if necessary.

Characterization of STEC surface proteins

STEC surface protein extraction

The STEC surface protein extraction protocol was adapted from (Del Canto et al., 2012). For each serotype studied, one strain was selected: O157:H7 str. EDL933; O26:H11 str. 21765; and

O103:H2 str. PMK5. For each strain, three individual colonies were grown overnight in 10 ml BHI at 37°C. Stationary cultures were centrifuged at 5,000 g for 5 min, washed twice in PBS (v/v), re-suspended in 100 µL of PBS, and heated at 60°C for 30 min. Heated suspensions were centrifuged at 5,000 g for 5 min. The supernatants, which contained the extracted proteins, were filtered through a 0.22 µm cellulose acetate microfiltration tube at 13,000 g for 3 min to eliminate any remaining bacterial cells. Protein extractions were confirmed by protein and DNA quantification and SDS-PAGE electrophoresis. Nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) was used for quantitative and qualitative analysis.

Tandem mass tag quantitative proteomics

The Tandem Mass Tag (TMT) quantitative method was used for relative quantification of STEC surface proteins (Dayon et al., 2008). Approximately 50 µg of each surface protein extract was DNase-treated (Turbo DNase, ThermoFisher, Dardilly, France) at 37°C for 1 h and then prepared for mass spectrometry (MS) analysis using the easyPep kit (ThermoFisher) according to the manufacturer's instructions. Samples were reduced and alkylated for 10 min at 95°C and then digested with LysC/Trypsin at a 1:10 ratio for 3 h at 37°C. Peptide samples were then purified on easyPep kit spin columns, dried, re-suspended in 50 µL of 100 mM tetraethylammonium bicarbonate (TEAB), and labeled according to the protocol supplied with the TMT™ 10plex 0.2 mg Kit (Thermo Scientific). Two micrograms of each labeled sample were pooled to ultimately have approximately 18 µg of protein. The pool was then desalted on a C18 spin column (Thermo Scientific Pierce). The samples were analyzed on a high-resolution orbitrap mass spectrometer Q Exactive HF (Thermo Scientific), coupled to nanoUHPLC (Thermo Scientific). Samples were analyzed in triplicate. One microliter of each sample was loaded onto a C18 Acclaim PepMap100 trap-column 300 µm ID x 5 mm, 5 µm, 100 Å (Thermo Fisher Scientific) for 3 min at 20 µL/min with 2% ACN, 0.05% TFA in H₂O and then separated on a C18 Acclaim Pepmap100 nano-column, 50 cm x 75 µm i.d., 2 µm, 100 Å (Thermo Fisher Scientific) with a 100-min linear gradient from 3.2 to 20% buffer B (A: 0.1% FA in H₂O, B: 0.1% FA in ACN), from 20 to 32% of B in 20 min and then from 32 to 90% of B in 2 min, hold for 10 min, and returned to the initial conditions in 1 min for 14 min. The total duration was set to 150 min with a flow rate of 300 nl/min and the oven temperature was kept constant at 40°C.

Labeled peptides were analyzed with the TOP15 HCD method: MS data were acquired in a data-dependent strategy selecting the fragmentation events based on the 15 most abundant precursor ions in the survey scan (375–1800 Th). The resolution of the survey scan was 120,000 at m/z 200 Th and for the MS/MS scan, the resolution was set to 45,000 at m/z 200 Th. The Ion Target Value for the survey scans in the Orbitrap and the MS/MS scan were set to 3E6 and 1E5, respectively, and the maximum injection time was set to 50 ms for the MS scan and 120 ms for the MS/MS scan. Parameters for acquiring HCD MS/MS spectra were

as follows: collision energy = 33 and an isolation width of 0.7 m/z. The precursors with unknown charge state or a charge state of 1 and 8 or greater than 8 were excluded. Peptides selected for MS/MS acquisition were then placed on an exclusion list for 30 s using the dynamic exclusion mode to limit duplicate spectra. MS data were reprocessed with Proteome Discoverer 2.4 software (Thermo Scientific) with the Sequest HT search engine against the total UniProt *E. coli* database (862,106 entries; octobre 2021) and the addition of a contaminant database, filtered at a false positive rate of 1%. Precursor mass tolerance was set at 10 ppm, fragment mass tolerance was set at 0.02 Da, and up to two missed cleavages were allowed. Oxidation (M) and acetylation (Protein N-terminus) were set as variable modifications and TMT labeled peptides in primary amino groups (K and N-ter) and carbamidomethylation (C) were set as fixed modifications. Validation of identified peptides and proteins was done using a target decoy approach with a false positive (FDR < 1%) via Percolator. Protein quantitation was performed with the reporter ions quantifier node in Proteome Discoverer 2.4 software with an integration tolerance of 20 ppm and peptide and protein quantitation based on pairwise ratios and t-test. The ratios of each protein identified were calculated between the three strains.

The differentially expressed proteins (DEPs) in strains O26:H11 21,765 and O103:H2 PMK5, compared with strain O157:H7 EDL933, were extracted based on the values of Log₂ abundance ratio < -1 and a value of *p* < 0.05. Further analysis or graphical representations were performed in “R” (R Core Team, 2021). Venn diagram and Gene Ontology (GO) term analysis were realized with “ggvenn” (Yan, 2022) and “UniprotR” (Soudy et al., 2020) packages, respectively. If the UniProt accession number assigned to a DEP was not fully annotated, the information was retrieved from homologous proteins in the UniProtKB database (>90% identity). DEPs associated with the outer membrane were selected from GO terms based on the presence of the keywords “cell adhesion” (biological process; BP) and/or “cell outer membrane” (cellular component; CC) and not located in the inner leaflet of the OM.

Qualitative proteomics

The equivalent of 2 µg of each TMT-labeled sample was mixed with the two other samples of the same strain, dried, re-suspended in 300 µL 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), and finally desalted on a high-capacity spin column (Thermo Fisher Scientific). The samples were re-suspended in 10 µL 0.1% AF and 1 µL was analyzed with the same nanoLC method as previously described and a TOP20 DDA HCD mode: MS data were acquired in a data-dependent strategy selecting the fragmentation events based on the 20 most abundant precursor ions in the survey scan (375–1,500 Th). The resolution of the survey scan was 60,000 at m/z 200 Th and for the MS/MS scan, the resolution was set to 15,000 at m/z 200 Th. The Ion Target Value for the survey scans in the Orbitrap and the MS/MS scan were set to 3E6 and 1E5, respectively, and the maximum injection time was set to 60 ms for the MS and MS/MS scans. Parameters for acquiring HCD

MS/MS spectra were as follows: collision energy = 27 and an isolation width of 2 m/z. The precursors with unknown charge state, charge state of 1 and 8, or greater than 8 were excluded. Peptides selected for MS/MS acquisition were then placed on an exclusion list for 20 s using the dynamic exclusion mode to limit duplicate spectra. MS data were reprocessed with Proteome Discoverer 2.5 software with the same parameters as previously described without reporter ion quantifier node. The initial database, composed of the total UniProt *E. coli* database (862,106 entries; octobre 2021) and a contaminant database, was completed with proteomic sequences of the three STEC strains obtained from genomic sequences via NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (EDL933: 5425 entries; 21,765: 5361 entries; PMK5: 1994 entries).

The subcellular localization of identified proteins was predicted using the PSORTb 3.0 Subcellular Localization Prediction Tool (Yu et al., 2010). Spectral counts (SpC) of each protein were used to estimate protein abundance. Protein abundance was expressed through the normalized spectral abundance factor (NSAF). NSAF was calculated, for each strain, according to the formula:

$$NSAF = \frac{SAF_i}{\sum_{i=1}^N SAF_i}$$

where i is a unique protein and N is the total number of proteins, while SAF is a protein spectral abundance factor that is defined as a protein spectral count divided by its length, as described by Pisanu et al. (2011).

The NSAF was calculated only on proteins that had at least three peptide matches and at least three unique peptides. For each strain, the relative abundance of the subcellular localization groups was obtained by normalizing relative abundance to the number of proteins assigned in the corresponding group.

Results

Evaluation of the non-specific interactions between STEC and MFGs

A value of CSH \leq 20% signified a hydrophilic tendency, a value between 20 and 50% corresponded to moderately hydrophobic strains, and a result above 50% indicated a hydrophobic profile (Benito et al., 1997; Lamari et al., 2018). The majority of the STEC/AEEC strains assayed had a CSH $<$ 25% and, therefore, a hydrophilic profile (Figure 2A). Three strains belonging to the O103:H2 serotype (str. 2,503, str. 32,396, str. 445–14) were hydrophobic, reaching a CSH between 45 and 70%. The *E. coli* K-12 MG1655 strain also showed a hydrophilic profile. The ζ -potential of MFGs in raw milk and in UFMP were -10.2 ± 0.6 mV and -12.2 ± 0.1 mV, respectively (Figure 2B).

The three AEEC strains assayed were negatively charged and their ζ -potential were of the same order of magnitude, from -3.6 to -2.8 mV (Figure 2B).

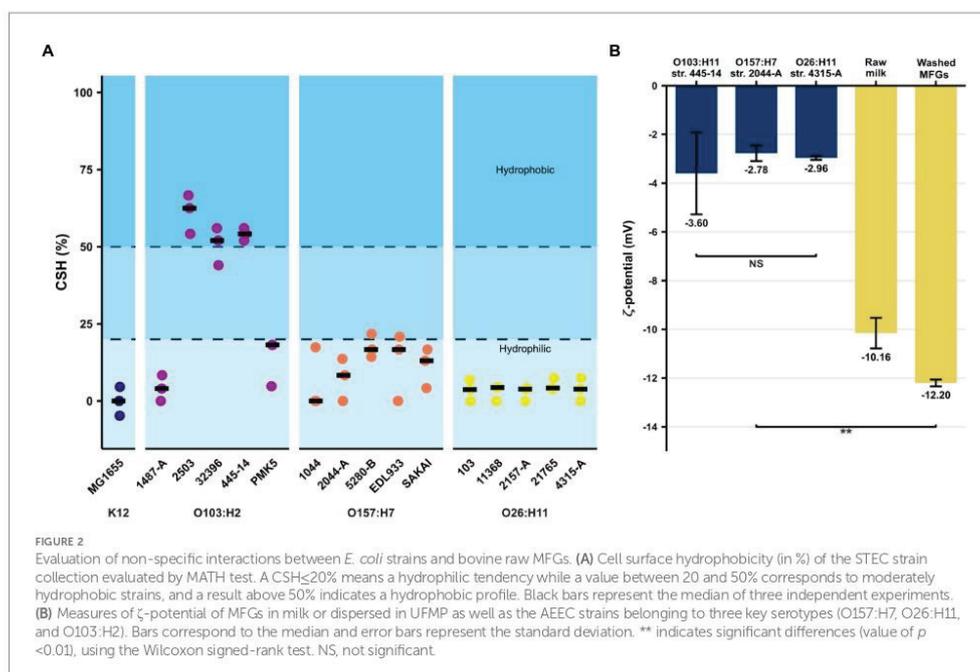
Evaluation of the capacity of *Escherichia* to adhere to milk fat globule membrane proteins

The increase in ΔTt as a function of the concentration of the MFGMP coating solution was graphically observed for the strains belonging to the O103:H2 and O26:H11 serotypes, as well as for the non-pathogenic K-12 MG1655 strain (Figure 3). This tendency was supported for these strains by the estimation of the slope of the regression equation's line (value of p is 0.05; Table 2). At the serotype level, *E. coli* O103:H2 strains showed a ΔTt of $7,342 \pm 3,391$ s at $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of MFGMPs, similar to the K-12 MG1655 strain ($7,203 \pm 2,276$ s). As for the O26:H11 strains, a ΔTt of $3,846 \pm 3,508$ s was observed. However, at the strain level, the O26:H11 str. 4,315-A reached a ΔTt of $529 \pm 1,460$ s and, therefore, exhibited weak adhesion to MFGMPs. On the contrary, no concentration effect was demonstrated for the O157:H7 strains since the slope of the regression line was not significantly different from zero (value of $p = 0.0841$; Table 2). At the maximal MFGMP concentration assayed ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), the estimated ΔTt was $-523 \pm 1,347$ s, suggesting a low capability to adhere to MFGMPs across all strains. At the maximal MFGMP concentration, a negative value for the delay of growth was estimated for all strains except for the 5,280-B strain. The results were $-420 \pm 2,169$, $-785 \pm 1,605$, -2054 ± 311 , -243 ± 415 , and 425 ± 565 , for the SAKAI, EDL933, 2044-A, 1044, and 5,280-B strains, respectively. Nevertheless, the O157:H7 str. 5,280-B displayed a negative ΔTt in some replicates ($\Delta Tt_{5280-B} = [-140; 990$ s]).

Characterization of STEC surface proteins

Qualitative proteomics analysis and relative protein abundance

A total of 1,157, 875, and 1,023 *E. coli* proteins were identified in STEC protein extracts from the O157:H7 EDL933, O26:H11 21,765, and O103:H2 PMK5 strains, respectively (Supplementary Tables 1–3). These proteins extracts were qualitatively composed primarily of proteins assigned to a cytoplasmic (37.1–47.8%), unknown (24.8–29.6%), or outer membrane (16.2–10.7%) localization (Figure 4A). Analysis of the relative abundance of each predicted localization showed a high percentage of proteins that were localized at the outer membrane (30.3–18.3%) or were secreted (41.55–9.4%) (Figure 4B). Interestingly, the amount of protein expected to be extracellular was lower for the 21,765 strain than for the other two strains. The quantitative proteomic approach showed that many cytoplasmic proteins were present in the STEC protein extracts in small

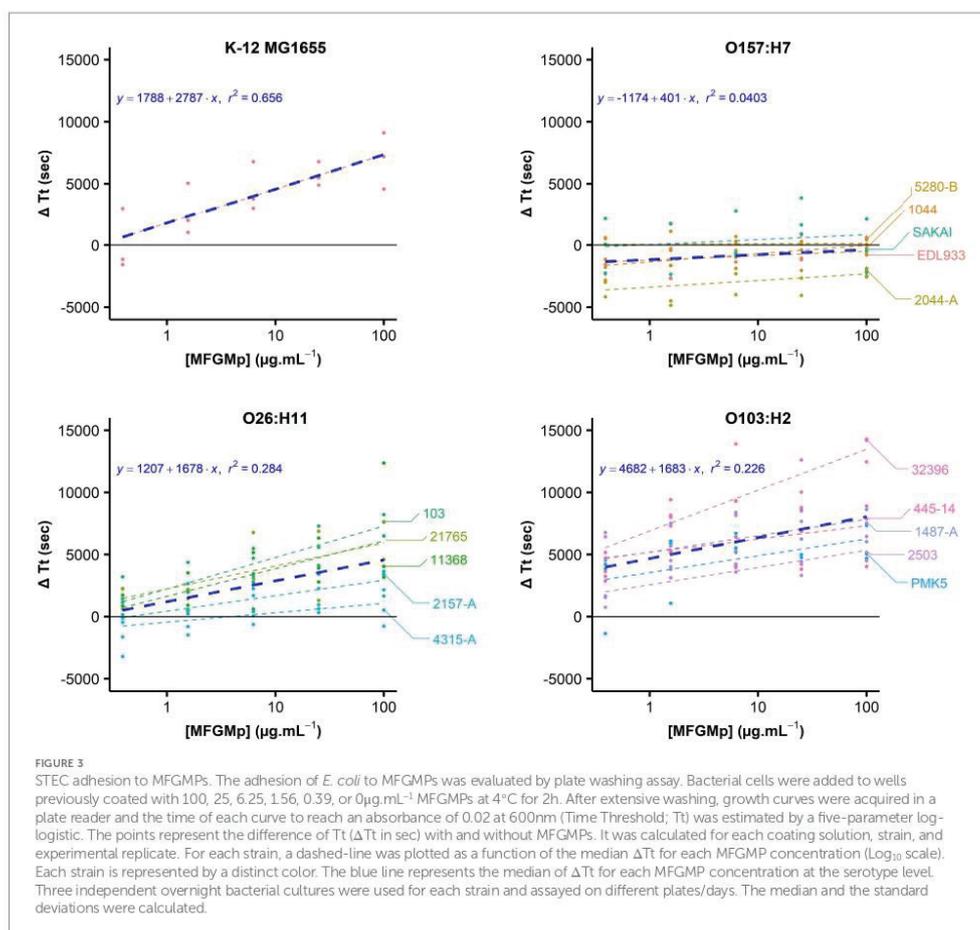


quantities, while fewer membrane proteins were present, but in larger quantities. **Figure 4C** shows the top 15 proteins in the extracts. The most abundant proteins in the extracts were predicted to be extracellular for the EDL933 strain (flagellin) and periplasmic for the 21,765 and PMK5 strains (acid stress chaperone HdeB). The relative abundance of the acid stress chaperone HdeB of the both strains was higher than the remaining proteins as indicated by the larger diameter of the bubble in **Figure 4C**. In the PMK5 strain, three outer membrane proteins were in the top 5 (the outer membrane porin C, the outer membrane lipoprotein SlyB and the major outer membrane lipoprotein Lpp). The most abundance proteins appeared to be similar for the 21,765 and PMK5 strains. For the EDL933 strain, the abundance seemed more homogenous. Regardless of the strain, 1,998 unique *E. coli* proteins were identified and among them, 316 (15.8%) were shared between the three strains (**Figure 4D**). EDL933 had the highest number of unique proteins (565 proteins, 28.3%), while 331 (16.6%) and 361 (18.1%) proteins were unique to the 21,765 and PMK5 strains, respectively.

Relative tandem mass tag quantitative proteomics

TMT-labeled sample analysis found 1,192 proteins that could be used for relative quantitative assessment (**Supplementary Table 4**). We found 87 and 91 proteins (a total of 178 proteins) that were expressed at least two-fold higher in the 21,765 and PMK5 strains

than in the EDL933 strain (**Figures 5A,B**). Among these 178 proteins, 40 proteins were present in both the 21,765 and PMK5 strains (**Figure 5C**) and 25 proteins were uncharacterized proteins for which no information was available even from homologous proteins (**Supplementary Table 5**). Consequently, 113 proteins were used for Gene Ontology (GO) term analysis to identify their subcellular localization and/or biological function (**Figure 6**). More proteins were associated with cellular component than with molecular function or biological process. The top 3 GO terms were “outer membrane-bounded periplasmic space” (17.12%), “cell outer membrane” (16.22%), and “periplasmic space” (13.51%). Concerning biological processes, “cell adhesion” was counted three times behind “ion transmembrane transport” (5), “cellular stress response to acidic pH,” and “chaperone-mediated protein folding” (4). In total, 17 proteins were associated with the biological processes “cell adhesion and/or the cellular component” or “cell outer membrane” and not localized in the inner leaflet of the OM or the periplasmic space (**Table 1**). Several outer membrane proteins (OmpC, OmpN, OmpP, NmpC, intimin, AIDA-I, maltoporin, LptD) and lipoproteins (Blc, LptE, LptB, TraT, BhsA) were more highly expressed in 21,765 or PMK5 strains than in the EDL933 strain. Five proteins (OmpN, OmpC, Blc, LptE) were expressed by both adhering strains (21,765 and PMK5) with an approximately equivalent fold change (FC) compared with the EDL933 strain (from 4.26 to 9.58, **Table 3**). The differentially expressed proteins (DEPs) had a FC between 2



and <10, except the autotransporter AIDA-I expressed by the 21,765 strain and the porin expressed by the PMK5 strain, which had FCs of approximately 23 and 13, respectively, compared with EDL933.

Discussion

Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) may cause severe human infections mainly through ingestion of contaminated food, including raw milk products. The milk fat globule membrane (MFGM), which surrounds MFGs, is well known for its anti-adhesive properties against pathogenic bacteria, including STEC (Ofek et al., 2003; Claeys et al., 2013; Yoon et al., 2016; Douëllou et al., 2018; Bagel and Sergentet, 2022). However, the mechanisms involved are unknown. We previously demonstrated that the

affinity of STEC for the enriched-MFG layer was serotype-dependent for the strains belonging to the O157:H7 serotype and strain-dependent for O26:H11 and O103:H2 strains (Bagel et al., 2022). Published literature suggests that (glyco)-proteins anchored to the MFGM may serve as potential ligands for bacteria, as well as for STEC adhesins, and thus act as mimetic receptors (Douëllou et al., 2017; Bagel and Sergentet, 2022). Some knowledge gaps exist regarding STEC adhesion strategies, especially for the non-O157 STEC strains (O26:H11 and O103:H2 strains) that are largely less studied than O157:H7 strains (Koutsoumanis et al., 2020). It is likely that STEC uses strain- and/or serotype-specific adhesion mechanisms to invade hosts. The nature and type of proteins exposed at the STEC surface could explain the strain and/or serotype effect in STEC's affinity for MFGs that we highlighted previously (Bagel et al., 2022). In this study, we used phenotypic assays to evaluate the capacity of STEC strains to form molecular

TABLE 2 Estimation of the coefficients and R^2 of the linear regressions of STEC adhesion to MFGMPs.

	K-12 MG1655	O157:H7	O26:H11	O103:H2
Slope (ΔTt in sec)	2,786.896*** (560.140)	400.708* (228.816)	1,678.107*** (318.459)	1,683.327*** (364.311)
Intercept (MFGMPs in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1,787.639** (652.840)	-1,173.620*** (266.684)	1,206.764*** (366.363)	4,681.656*** (424.603)
R^2	0.656	0.040	0.284	0.226

For each serotype (O157:H7, O26:H11, O103:H2) and the K-12 MG1655 strain, a simple linear regression was used to assess the relationship between the time threshold for bacterial growth (ΔTt) and the amount of MFGMPs. Standard errors are indicated in parentheses.

* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$.

interactions with bovine milk fat globule membrane proteins (MFGMPs) and proteomics to highlight adhesion factors potentially involved in this phenomenon.

We evaluated the major non-specific interactions involved in bacterial adhesion (hydrophobic and surface charge). At the collection level, STEC and AEEC strains were mainly hydrophilic, except for three strains belonging to the O103:H2 serotype (Figure 2). Hamadi et al. (2008) showed by water contact angle that *E. coli* strains are hydrophilic. However, the *E. coli* O157:H7 strain has also been described as hydrophobic (Patel et al., 2011). Witsø et al. (2014) reported a cell surface hydrophobicity of between 50 and 70% for *E. coli* O103:H2 strains, consistent with our results. Bacterial hydrophobic forces are influenced by the nature of the membrane-anchored components, including amino residues that are exposed to the extracellular environment (Law, 2015). MFGs are highly hydrophobic in their central region (hydrophobic TAG core) but the MFGM, rich in polar lipids and glycoconjugates, allows MFGs to float in the aqueous phase of milk (Corredig and Dalglish, 1998; Chevalier and Sommerer, 2011). Globally, MFGs and STEC are both dispersed in the aqueous phase of milk due to the polar properties of the components anchored in their membrane (proteins, polar lipids). Hydrophobic forces are also influenced by physicochemical conditions such as temperature, A_w , ionic strength, and pH (Hamadi et al., 2004). Moreover, several parameters intrinsic to the MATH test such as vortex time, hydrophilic phase/hydrophobic phase ratio, and solvent type, can influence results (Nachtigall et al., 2019). Similarly, culture conditions directly affect the formation of hydrophobic bonds mainly by modulating surface protein expression.

We found that the surface charges of MFGs and the AEEC strains in the real aqueous phase of raw milk were both negative and of similar orders of magnitude: -12.2 ± 0.14 to -10.7 ± 0.6 mV and -3.7 ± 0.2 to -2.9 mV, respectively. Our results are similar to published data showing that the surface charge of raw MFGs is between -12.2 and -9 mV (Lopez et al., 2007; Obeid et al., 2019; Verma et al., 2019). The bacterial cell surface is generally negatively charged because of the carboxyl and phosphate core as well as the

lipopolysaccharide (LPS) located at the surface (Hong and Brown, 2008). The surface charge of *E. coli* is reported to be negative (Kłodzińska et al., 2010). Furthermore, Liang et al. (2016) showed a large range in ζ -potential that varies according to *E. coli* strain (-6.8 to -39.9 mV). ζ -potential measurements were made at pH 6.7 in presence of milk minerals that screen negative charges. In a previous study, we showed that AEEC strains have different affinities for the raw milk layer (Bagel et al., 2022), suggesting that bacterial surface charges may not be the main factor influencing STEC-MFG association. It appears that non-specific interactions are not strongly involved in opposing electrostatic forces and that, instead, specific/molecular interactions may be implicated. Interestingly, we have shown that the O103:H2 str. 2503, str. 32396, and str. 445-14 display a similar affinity for the raw milk cream layer and these strains have a hydrophobic profile (Bagel et al., 2022). However, there are other non-specific interactions involved in bacterial adhesion to a surface, such as Lewis and Van Der Waals bonds (van Loosdrecht et al., 1990; Chen et al., 2014). Non-specific interactions alone cannot explain STEC's affinity for MFGs. These results suggest that other adhesion mechanisms such as specific interactions must be involved in STEC's affinity for MFGs.

Here we have demonstrated, for the first time to our knowledge, STEC's capacity to adhere to MFGMPs and we have highlighted a serotype effect. For 10 of the 16 assessed strains, the ΔTt increased as a function of the MFGMP concentration (Figure 3), suggesting an adhesion to these ligands. Among the strains analyzed, all O103:H2 strains, four O26:H11 strains, and the K-12 MG1655 strains seemed capable of adhering to MFGMPs. However, the strains belonging to the O157:H7 serotype ($n=5$) and O26:H11 str. 4,315-A adhered very weakly to MFGMPs in our experimental conditions. Moreover, we found that the presence of the *stx* gene (STEC vs. AEEC) and the strain origin (Table 1) did not seem to be correlated with adhesion capacity. We obtained similar results across independent experimental replicates, supporting the hypothesis that STEC-MFGMP adhesion is specific rather than non-specific. However, our results are quite surprising compared with the results of previously published experiments. We previously found that STEC strains belonging to the O157:H7 serotype have a higher capacity than O26:H11 and O103:H2 serotypes to concentrate in the cream of raw milk, which is rich in MFGs (Douëllou et al., 2018; Bagel et al., 2022). We assumed that a high concentration capacity in the cream was correlated with high capacity to adhere to MFGMPs. In our plate-washing experiment, it may be possible that the interaction of the O157:H7 strains with MFGMPs was weaker than the other strains or that the molecular targets of the O157:H7 strains may have been absent from the MFGM protein extract, denatured during the extraction process, or did not coat the wells. Furthermore, the mechanism underlying the concentration of STEC in the cream layer during natural creaming may be related to a completely different mechanism.

MFGMPs are membrane-bound proteins with both a hydrophilic region that is exposed to an aqueous environment at

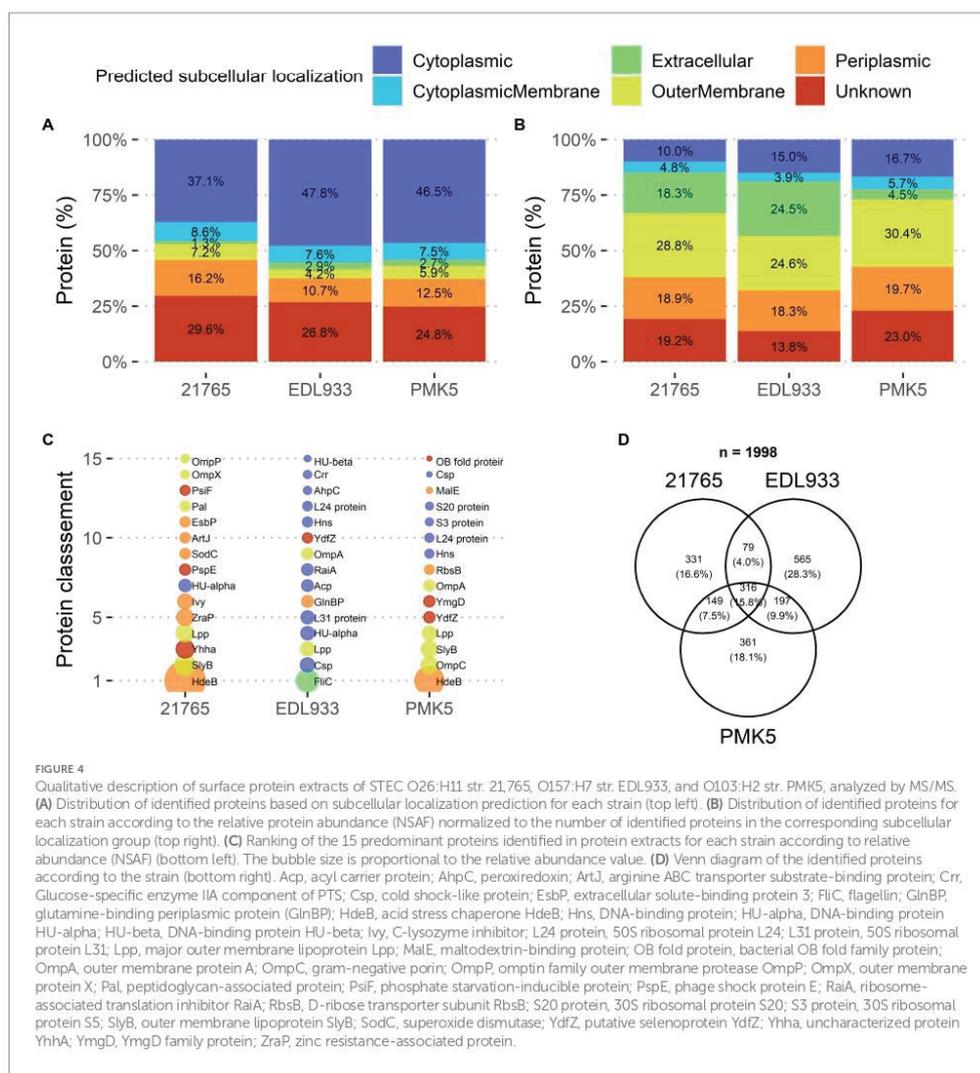
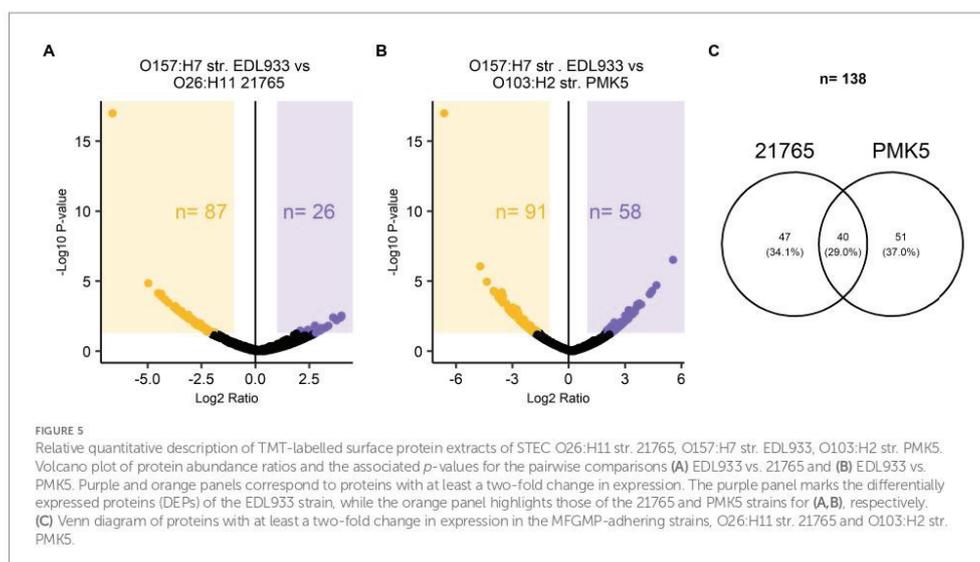


FIGURE 4 Qualitative description of surface protein extracts of STEC O26:H11 str. 21765, O157:H7 str. EDL933, and O103:H2 str. PMK5, analyzed by MS/MS. **(A)** Distribution of identified proteins based on subcellular localization prediction for each strain (top left). **(B)** Distribution of identified proteins for each strain according to the relative protein abundance (NSAF) normalized to the number of identified proteins in the corresponding subcellular localization group (top right). **(C)** Ranking of the 15 predominant proteins identified in protein extracts for each strain according to relative abundance (NSAF) (bottom left). The bubble size is proportional to the relative abundance value. **(D)** Venn diagram of the identified proteins according to the strain (bottom right). Acp, acyl carrier protein; AhpC, peroxiredoxin; ArtJ, arginine ABC transporter substrate-binding protein; Crr, Glucose-specific enzyme IIA component of PTS; Csp, cold shock-like protein; EsbP, extracellular solute-binding protein S; FicC, flagellin; GlnBP, glutamine-binding periplasmic protein (GlnBP); HdeB, acid stress chaperone HdeB; Hns, DNA-binding protein; HU-alpha, DNA-binding protein HU-alpha; HU-beta, DNA-binding protein HU-beta; Ivys, C-lysozyme inhibitor; L24 protein, 50S ribosomal protein L24; L31 protein, 50S ribosomal protein L31; Lpp, major outer membrane lipoprotein Lpp; MalE, maltodextrin-binding protein; OB fold protein, bacterial OB fold family protein; OmpA, outer membrane protein A; OmpC, gram-negative porin; OmpP, ompin family outer membrane protease OmpP; OmpX, outer membrane protein X; Pal, peptidoglycan-associated protein; PsiF, phosphate starvation-inducible protein; PspE, phage shock protein E; RaiA, ribosome-associated translation inhibitor RaiA; RbsB, D-ribose transporter subunit RbsB; S20 protein, 30S ribosomal protein S20; S3 protein, 30S ribosomal protein S5; SlyB, outer membrane lipoprotein SlyB; SodC, superoxide dismutase; YdfZ, putative selenoprotein YdfZ; Yhha, uncharacterized protein Yhha; YmgD, YmgD family protein; ZraP, zinc resistance-associated protein.

the surface of MFGs and a hydrophobic region anchored in the polar lipid trilayer in the membrane. Protein structure can be affected during extraction, leading to conformations that are different to the native conformation in the MFGM, which can hide the epitopes recognized by STEC for adhesion. Moreover, free MFGMPs may clump together, preventing the access of the epitopes to STEC. In addition to what has been said, the hydrophobic domains of the MFGMPs are not accessible to bacteria when they encounter intact MFGs, whereas in our trial these domains may have served as an anchoring point. To improve

this model, we intend to work directly on MFGMPs in their original state, e.i. anchored in a biological membrane.

In addition, negative ΔT_t values were observed for some strains, in particular the strains belonging to the O157:H7 serotype. A negative value corresponds to a loss of cells and could suggest that MFGMPs affect the viability of STEC strains. MFGMPs, especially xanthine oxidoreductase, have anti-bacterial properties (Martin et al., 2004). However, the bacteriostatic or bacteriocidal effect of MFGMPs in our experimental conditions was very weak. We previously evaluated the impact of MFGMPs



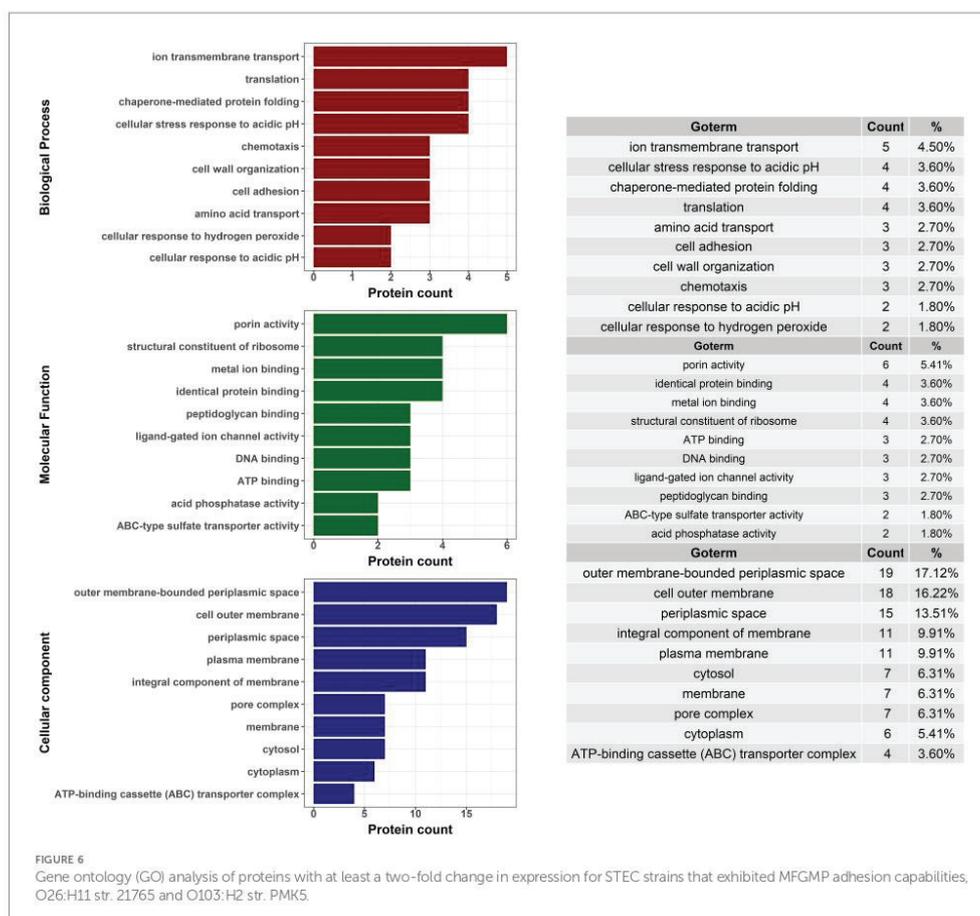
on STEC growth and found that the presence of MFGMPs did not affect cell viability and did not modulate strain growth (data not shown). Therefore, the negative ΔT_t values in this study seem to be more related to the sensitivity of the measurement method than to a biological phenomenon (the zero was included in the standard deviation), except for the O157:H7 str. 2,054 which had consistently negative values in all experiments.

In the second part of this work, we aimed to identify STEC surface proteins that were preferentially expressed by O26:H11 str. 21,765 and O103:H2 str. PMK5 and, therefore, represented an adhesion profile for MFGM. Previous studies have shown that the presence of MFGs can modulate adhesion of bacterial cells, including STEC (Ross et al., 2016; Douéllou et al., 2018). We can therefore assume that the STEC proteins involved in the recognition of eukaryotic cells play a role in MFG adhesion. Studies on STEC diversity have shown a clustering of strains according to serotype. Furthermore, strains belonging to O26:H11 and O103:H2 serotypes were grouped into subgroups. In this study, we found that more proteins were specific to the O157:H7 str. EDL933 than the two other strains analyzed (Figure 4D). It is possible that the O157:H7 str. EDL933, which is genetically different from the other strains of the collection, did not have or did not express adhesion factors that recognize MFGMPs. The surface protein extracts from the O157:H7 str. EDL933, O26:H11 str. 21,765, and O103:H3 str. PMK5 were characterized by TMT-nLC-MS/MS to determine cell surface components that may influence the adhesion of STEC to MFGMPs. Quantitative proteomic analysis showed that the O26:H11 str. 21,765 and O103:H3 str. PMK5 differentially expressed five outer membrane-associated proteins or lipoproteins, compared with the EDL933 strain (Table 3). This analysis also showed strain-specific

differentially expressed proteins (DEPs) that could be involved in a strain-dependent adhesion mechanism. In the O26:H11 21,765 strain, four proteins or glycolipids were differentially expressed, while eight DEPs were found in the PMK5 strain.

Several outer membrane proteins (OMPs) involved in STEC eukaryotic cell adhesion were identified in both the 21,765 and PMK5 extracts. The outer membrane proteins C (OmpC) and N (OmpN), common to the 21,765 and PMK5 strains, are both porins allowing passive diffusion of small molecules across the outer membrane (OM). OmpN has been less well characterized in the literature, but has a high homology to OmpF and OmpC (Prilipov et al., 1998; Dam et al., 2017). We also identified two other membrane proteins in 21,765: (1) the outer membrane protein P (OmpP) is an outer membrane protease that belongs to the omptin family and protects cells from cationic antimicrobial peptides and inflammatory responses and promotes adherence to eukaryotic cells (Hritonenko and Stathopoulos, 2007; Hwang et al., 2007) and (2) a putative porin that has 50% homology with the YedS porin of the *E. coli* K-12 MG1655 strain. In the PMK5 strain, the porin NmpC, homologous to OmpC and OmpF (Prilipov et al., 1998), was detected, as well as an OMP homologous to OmpC and associated with the accession number D7Y4X5. NmpC is not expressed in the K-12 MG1655 strain (Blasband et al., 1986), which displayed an adhesion profile. Several porins similar to OmpC have been identified.

OmpC deletion decreases the adhesion and invasion capacities of *E. coli* for intestinal epithelial cells (Rolhion et al., 2007). Furthermore, OmpC binds lactoferrin, a glycoprotein found in milk (Sallmann et al., 1999). Lactoferrin is a minor protein of MFGMs (Lee et al., 2018). Therefore, OmpC, and perhaps homologous porins, may bind lactoferrin in MFGMs.



The OmpA encoded by some *E. coli* strains has affinity for the GlcNAc- β -(1,4)-GlcNAc epitopes that comprise the core of all N-linked glycans (Prasadarao et al., 1996). N-glycosites, including mucins (MUC15 and MUC1), butyrophilin (BTN), lactadherin (LDH) and cluster of differentiation 36 (CD36), have been found on the extracellular domain of bovine MFGMPs (O'Riordan et al., 2014). Mannose residues are present on BTN and CD36 (O'Riordan et al., 2014). We also identified another porin, the maltoporin LamB, involved in the transport of maltose and maltodextrins, in the PMK5 strain. LamB is an alternative or additional adherence factor for EPEC and acts as a receptor for several bacteriophages (Randall-Hazelbauer and Schwartz, 1973; Subramanian et al., 2008). The PMK5 strain also expressed the OMP BhsA, which lowers the permeability of the outer membrane to copper and modulates biofilm formation by decreasing cell aggregation and cell surface adhesion (Zhang et al., 2007; Mermod et al., 2012).

The major type 1 subunit fimbrin (FimA) that constitutes the pilus rod of the Type 1 Fimbriae (T1F), was also identified in the PMK5 strain. While the *fimA* gene sequence is highly variable between different *E. coli* strains (Kisiela et al., 2013), FimA expression was not significantly different in PMK5 compared with 21,765, suggesting that this strain also expresses a significant amount of the protein (Table 3). The key adhesin component in T1F is carried by FimH which can bind to the mannose residues of some receptors on eukaryotic cells (Ageorges et al., 2020). We identified FimH in the three protein extracts but the expression ratio was not significantly different (Table 3). *E. coli* T1F can bind to glycoprotein 2 (zymogen granule membrane), a minor protein anchored at the MFGM (Murgiano et al., 2009). In addition, a study by Shaikh et al. (2007) found an N135K mutation in FimH of *E. coli* O157:H7 strains belonging to the cluster 2 and 3, including the EDL933 and SAKAI strains, that impaired the affinity for mannose. A decrease in mannose

TABLE 3 Surface proteins of STEC O26:H11 21,765 and O103:H2 PMK5 strains that could be involved in MFGMP adhesion.

Strain	Protein	Accession (homologous)	Gene ontology (GO)	Fold change of 21,765 compared with EDL933 (p-value)	Fold change of PMK5 compared With EDL933 (p-value)	Fold change of 21,765 compared with PMK5 (p-value)
21765 and PMK5	Outer membrane protein N	F4NE19	Cell outer membrane [GO:0009279]; pore complex [GO:0046930]; porin activity [GO:0015288]; ion transmembrane transport [GO:0034220]	4.99 (0.0282)	5.78 (0.0082)	1.14 (0.8560)
21765 and PMK5	Outer membrane lipoprotein Blc	A0A7U9G1P7	Cell outer membrane [GO:0009279]; lipid binding [GO:0008289]	5.90 (0.0172)	4.06 (0.0311)	1.17 (0.6747)
21765 and PMK5	Outer membrane pore protein C	D6LC31	Cell outer membrane [GO:0009279]; pore complex [GO:0046930]; porin activity [GO:0015288]; ion transmembrane transport [GO:0034220]	8.94 (0.0040)	9.00 (0.0011)	1.17 (0.8095)
21765 and PMK5	LPS-assembly lipoprotein LptE	W8T1H6	Cell outer membrane [GO:0009279]; Gram-negative bacterium-type cell outer membrane assembly [GO:0043165]	9.58 (0.0031)	3.89 (0.0314)	2.60 (0.0388)
21765 and PMK5	LPS-assembly protein LptD	A0A0K3M6Z5 (P31554)	Cell outer membrane [GO:0009279]; transporter complex [GO:1990351]; Gram-negative bacterium-type cell outer membrane assembly [GO:0043165]; lipopolysaccharide export [GO:0015921]; response to organic substance [GO:0010033]	6.15 (0.0129)	4.26 (0.0147)	1.49 (0.3188)
21765	Outer membrane porin protein (fragment)	K4V655	Cell outer membrane [GO:0009279]; pore complex [GO:0046930]; porin activity [GO:0015288]; ion transmembrane transport [GO:0034220]	8.22 (0.0055)	1.60 (0.3668)	5.66 (0.0002)
21765	OmpU family outer membrane protease (OmpP)	A0A5D8M8W6	Cell outer membrane [GO:0009279]; integral component of membrane [GO:0016021]; aspartic-type endopeptidase activity [GO:0004190]	8.28 (0.0054)	1.16 (0.6792)	6.96 (0.0000)
21765	Autotransporter adhesin AIDA-1 (Diffuse adherence adhesin)	F8SKE5	Cell outer membrane [GO:0009279]; cell surface [GO:0009986]; extracellular region [GO:0005576]; integral component of membrane [GO:0016021]; periplasmic space [GO:0042597]	22.94 (0.0001)	1.47 (0.7208)	34.06 (0.0000)
21765	Intimin (Attaching and effacing protein) (Eae protein)	A0A3Z7YG60 (Q07591)	Cell outer membrane [GO:0009279]; integral component of membrane [GO:0016021]; cell adhesion [GO:0007155]	8.34 (0.0053)	1.11 (0.7209)	7.11 (0.0000)

(Continued)

TABLE 3 (Continued)

Strain	Protein	Accession (homologous)	Gene ontology (GO)	Fold change of 21,765 compared with EDL933 (p-value)	Fold change of PMK5 compared With EDL933 (p-value)	Fold change of 21,765 compared with PMK5 (p-value)
PMK5	Intimin (Attaching and effacing protein) (Eae protein)	H3JY43	Cell outer membrane [GO:0009279]; integral component of membrane [GO:0016021]; cell adhesion [GO:0007155]	1.49 (0.4568)	6.11 (0.0065)	4.92 (0.0013)
PMK5	Outer membrane porin protein NmpC	D6I5J3	Cell outer membrane [GO:0009279]; pore complex [GO:0046930]; porin activity [GO:0015288]; ion transmembrane transport [GO:0034220]	1.12 (0.6560)	6.23 (0.0059)	5.62 (0.0005)
PMK5	TraI complement resistance protein	D9ZAU4	Cell outer membrane [GO:0009279]; conjugation [GO:000746]; regulation of conjugation [GO:0046999]	1.29 (0.6466)	9.38 (0.0009)	8.34 (0.0000)
PMK5	Gram-negative porin	D7Y4X5	Cell outer membrane [GO:0009279]; pore complex [GO:0046930]; porin activity [GO:0015288]; ion transmembrane transport [GO:0034220]	1.39 (0.6251)	13.00 (0.0002)	8.63 (0.0000)
PMK5	Multiple stress resistance protein BtsA (Copper-induced outer membrane component)	A0A070FQT8 (P0AB40)	Cell outer membrane [GO:0009279]; response to copper ion [GO:0046688]	3.27 (0.0949)	3.01 (0.0451)	1.09 (0.7891)
PMK5	Vitamin B12 transporter BtuB (Cobalamin receptor) (Outer membrane cobalamin translocator)	A0A0E1LF30 (A8A774)	Cell outer membrane [GO:0009279]; pore complex [GO:0046930]; ABC-type vitamin B12 transporter activity [GO:0015420]; metal ion binding [GO:0046872]; porin activity [GO:0015288]; ion transport [GO:0006811]	2.43 (0.1598)	3.78 (0.0395)	1.27 (0.6785)
PMK5	Maltoporin LamB	A0A070V5G2 (A7ZUQ8)	Cell outer membrane [GO:0009279]; pore complex [GO:0046930]; maltodextrin transmembrane transporter activity [GO:0042958]; maltose transporting porin activity [GO:0015481]; ion transport [GO:0006811]	1.14 (0.6401)	5.03 (0.0141)	4.69 (0.0019)
PMK5	Major type 1 subunit fimbriae (Pilin)	A0A0H2Y310	Pilus [GO:0009289]; cell adhesion [GO:0007155]	1.88 (0.3656)	3.53 (0.0295)	2.03 (0.1283)

Fold change (FC) was calculated by comparing the protein abundance in the 21,765 and PMK5 strains with that in the EDL933 strain, which showed low adhesion to MFCs. For each strain, three independent protein extracts were analyzed to perform statistical analysis (t-test and the associated value of p).

adhesion capabilities of O157:H7 strains, but not O103:H2 and O26:H11 strains, which have an intact FimH protein, could help to explain our results.

In addition, the β -subtype of intimin, which is responsible for attaching and effacing lesions, was identified in the 21,765 strain, while the ϵ -subtype was identified in the PMK5 strain (Table 3). These two intimin variants are different from the γ -subtype variant identified in the EDL933 strain (Supplementary Table 1). Intimin is the main eukaryotic cell adhesion factor of STEC, forming a very specific adhesion bond with Tir (Translocated intimin receptor), as well as with eukaryotic proteins nucleolin and β 1 integrin (Sinclair et al., 2006). The MFGM expresses low levels of integrins but has not been shown to express nucleolin (Bagel and Sergentet, 2022). The 21,765 strain also expresses the AIDA-I autotransporter which acts as a bacterial adhesin mediating attachment to a broad variety of mammalian cells and facilitating bacterial autoaggregation (Vo et al., 2017). AIDA-I is also a highly efficient initiator of biofilm formation (Sherlock et al., 2004) and is involved in cellular adhesion of diarrheagenic *E. coli* (DEC) (Ageorges et al., 2020).

The 21,765 and PMK5 strains also differentially expressed some outer membrane lipoproteins (Blc and the LptD-LptE complex). The lipoprotein Blc belongs to the lipicalin family, an important class of lipid transfer proteins that are anchored in the inner leaflet of the outer membrane and bind to fatty acids or phospholipids (Campanacci et al., 2004, 2006). LPS-assembly protein LptD and lipoprotein LptE form a complex at the OM surface, allowing transport of LPS at the cell surface (Sperandeo and Polissi, 2016). We do not have sufficient information to conclude whether these proteins are directly involved in bacterial and MFGMP adhesion. The O-antigen, which is part of LPS, is a highly variable region that is used to classify bacteria based on sugar composition (Liu et al., 2020). In addition, the flagellar H antigen (*flhC*), which is used as a complement to O-antigen for classification, is known to be involved in adhesion. Furthermore, the FliC protein, specific to each strain assayed, composed the majority of the protein extract of the EDL933 and PMK5 strains (Supplementary Tables 1, 2). Therefore, FliC₁₂ of the PMK5 strain could be involved in MFGMP adhesion. PMK5 also expressed: (1) the vitamin B12 transporter BtuB, involved in the active translocation of vitamin B12 across the outer membrane to the periplasmic space and (2) the TraT protein, an OM lipoprotein that prevents unproductive conjugation between bacteria carrying similar plasmids. There is no published evidence that these lipoproteins are involved in bacterial adhesion although BtuB was described as a phage receptor (Li et al., 2019).

Of the 178 DEPs highlighted by our study, 25 DEPs were not included in our further analysis due to gaps in available information (Supplementary Table 5). Further characterization of these proteins could highlight novel protein candidates. In addition, we found that protein extracts were mainly enriched in proteins associated with the outer membrane or the extracellular

component (Figure 4B). However, we also identified a large proportion of periplasmic proteins, reflecting leakage during the extraction protocol of the periplasmic content. In contrast, few cytoplasmic membrane proteins were identified although cytoplasmic proteins were identified. These proteins may have originated from dead cells remaining in the culture medium or have leaked from the inner membrane. Some external membrane proteins could not be correctly extracted and therefore are absent from the analysis. We can also point out that some proteins that are more sensitive to heat than others might not be included in the extract. Therefore, these proteins, potentially involved in the adhesion process, are not covered by the study. Future studies using a more global approach may identify more proteins involved in this adhesion phenomenon.

In this study, we fixed the temperature of the STEC-MFGMP adhesion assay to 4°C to evaluate the adhesion of STEC to MFGMPs in milk storage conditions. Although contamination of raw milk with STEC mainly occurs during milking when the milk temperature reaches 37°C, milk is rapidly refrigerated to 4°C to assure its conservation (Quigley et al., 2013; Machado et al., 2017; Skeie et al., 2019). To exert their anti-adhesive properties against STEC, the STEC-MFG association must be possible in the environmental conditions of the human intestinal system. Therefore, the results observed here do not indicate that *E. coli* O157:H7 strains do not possess MFG adhesion capacity. As physicochemical parameters govern adhesion steps, further analysis of the effect of other parameters, such as pH, ionic strength, and temperature could help to understand the low adhesion of *E. coli* O157:H7 strains to MFGMPs observed in this study. The impact of these environmental factors on STEC-MFG association, as well as the presence of microbiota, should be evaluated to ensure that STEC-MFGMP interactions are achievable in the human GI tract. The adaptation of STEC to environmental factors could also explain the lower prevalence of STEC O157:H7 strains in raw milk products than STEC O26:H11 and O103:H2 strains (EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021). The serotype-dependent adhesion observed in this study shows the same pattern as the prevalence data. Bacteria belonging to the O26:H11 and O103:H2 serotypes, which seem to be more adapted to survival in milk and cheese (Miszczycha et al., 2013), show adhesion to MFGMPs. O157:H7 serotype bacteria grow more slowly than O26:H11, O103:H2, and O145:H28 serotypes. These data suggest that O26:H11, O103:H2, and O145:H28 strains may be better adapted to the environment (physicochemical parameters and microbiota) found in cheeses. The ability of STEC cells to adhere to MFGs could be considered to be an advantageous mechanism.

The use of antibiotics to treat STEC infection is particularly contentious due to their impact on the expression of Shiga toxin genes. In the field of health and nutrition, raw milk fat is gaining popularity due to the richness and variety of proteins linked to its membrane. MFGMP's anti-adhesive abilities against pathogenic bacteria, including STEC, might be a promising prophylactic and alternative approach to anti-infection

treatments. As bacterial adhesion is the first step of infection, inhibiting this step is a key strategy for infection control. Competition for the natural binding sites of pathogenic bacteria by mimetic receptors could inhibit pathogen attachment. Such strategies have already been described for other enteric pathogens (Asadi et al., 2019). The mechanisms of adhesion between STEC and MFGM should be further studied to uncover new therapeutic solutions. Here, we highlight some outer membrane proteins or lipoproteins that may be involved in the adhesion of STEC to MFGs but further studies are needed. It will be essential to validate the involvement of STEC candidate proteins in adhesion to MFGs and intestinal cells and to further identify their ligands among MFGMPs.

Conclusion

In this study, adhesion of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) to milk fat globule membrane proteins (MFGMPs) was observed for the first time and a serotype effect was discovered. The strains belonging to the O157:H7 serotype showed no adhesion to MFGMPs, whereas the strains belonging to the O26:H11 and O103:H2 serotypes appeared to adhere to MFGMPs. We also showed that non-specific interactions, hydrophobic forces, and surface charges do not seem to be major forces involved in STEC-MFG association. We identified several outer membrane proteins—OmpC and homologous proteins, intimin, Type 1 Fimbriae, and AIDA-I—that may be involved in STEC-MFG adhesion. More work is needed to elucidate the level of involvement of these proteins. As stated in the published literature, bacteria-MFGMP adhesion is a complex and multifactorial mechanism, likely involving several different strategies depending on the strain and/or serotype. The adhesion capabilities and the strength of STEC-MFGMP association needs to be further studied in various biological environments, such as raw milk cheese products and the human gastrointestinal tract, to follow the evolution of the STEC-MFG complex and their anti-adhesion properties to intestinal epithelium.

Data availability statement

The data presented in the study are deposited in the MassIVE repository, accession number MSV000089913.

Author contributions

AB, CL, VM, TD, and DS contributed to conception and design of the study. AB, ED-B, and CL performed the experiments. AB realized data analysis and visualization. AB and DS wrote the first draft of the manuscript. CL, VM, and TD reviewed and edited

the work. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This study was funded by the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL, French Dairy Interbranch Organization, Paris). The French Ministry of Agriculture (Paris, France) and VetAgro Sup (Marcy-L'Etoile, France) have also funded part of this work.

Acknowledgments

We thank the staff of the French National Reference Laboratory on pathogenic *E. coli* (including STEC) (Marcy-L'Etoile, France). We acknowledge E. Jaffres (SECALIM, ONIRIS, Nantes) and his team for hosting us in their P2 microbiology lab, Adeline Page and Cécile Hilpert from Protein Science Facility, SFR Biosciences, for proteomics analysis (SFR BioSciences, CNRS UAR3444, Inserm US8, UCBL, ENS de Lyon, Lyon, France), and the financial support from ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences and Health) within the framework of the cancer plan for Orbitrap mass spectrometer founding. We also thank Leah Cannon (Lyon, France) for the English language editing of this manuscript.

Conflict of interest

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

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1010665/full#supplementary-material>

References

- Aggeorgis, V., Monteiro, R., Leroy, S., Burgess, C. M., Pizzi, M., Chaucheyras-Durand, F., et al. (2020). Molecular determinants of surface colonisation in diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC): from bacterial adhesion to biofilm formation. *FEMS Microbiol. Rev.* 44, 314–350. doi: 10.1093/femsre/fuaa008
- Asadi, A., Razavi, S., Talebi, M., and Gholami, M. (2019). A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases. *Infection* 47, 13–23. doi: 10.1007/s15010-018-1222-5
- Bachmann, B. B. J. (1996) in *Derivation and Genotypes of Some Mutant Derivatives of Escherichia coli K-12* eds. A. S. M. Neidhardt. (Washington DC: ASM Press) 2460–2488.
- Bagel, A., Delignette-muller, M.-L., Lopez, C., Michd, V., Sergentet-Thevenot, D., and Douëllou, T. (2022). Strain- and serotype-dependent affinity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* for bovine milk fat globules. *J. Dairy Sci.* 8688–8704. doi: 10.3168/jds.2022-21840
- Bagel, A., and Sergentet, D. (2022). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and Milk fat globules. *Microorganisms* 10:496. doi: 10.3390/microorganisms10030496
- Blasband, A. J., Marcotte, W. R., and Schnaitman, C. A. (1986). Structure of the I_c and mmpC outer membrane porin protein genes of lambdaD61 bacteriophage. *J. Biol. Chem.* 261, 12723–12732. doi: 10.1016/S0021-9258(18)67152-2
- Benito, Y., Pin, C., Marin, M. L., Garcia, M. L., Selgas, M. D., and Casas, C. (1997). Cell surface hydrophobicity and attachment of pathogenic and spoilage bacteria to meat surfaces. *Meat Sci.* 45, 419–425. doi: 10.1016/S0309-1740(96)00133-7
- Berne, C., Ellison, C. K., Ducret, A., and Brun, Y. V. (2018). Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 616–627. doi: 10.1038/s41579-018-0057-5
- Campanacci, V., Bishop, R. E., Blangy, S., Tegoni, M., and Cambillau, C. (2006). The membrane bound bacterial lipocalin Blc is a functional dimer with binding preference for lysophospholipids. *FEBS Lett.* 580, 4877–4883. doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.086
- Campanacci, V., Nurizzo, D., Spinelli, S., Valencia, C., Tegoni, M., and Cambillau, C. (2004). The crystal structure of the *Escherichia coli* lipocalin Blc suggests a possible role in phospholipid binding. *FEBS Lett.* 562, 183–188. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00199-1
- Chen, Y., Harapanahalli, A. K., Busscher, H. J., Norde, W., and van der Mei, H. C. (2014). Nanoscale cell wall deformation impacts long-range bacterial adhesion forces on surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 637–643. doi: 10.1128/AEM.02745-13
- Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., et al. (2013). Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. *Food Control* 31, 251–262. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.09.035
- Chevalier, F., and Sommerer, N. (2011). "Analytical Methods/Mass Spectrometric Methods" in *Encyclopedia of Dairy Sciences*. (Second Edition) ed Elsevier Reference Collection. (Mississippi State, MS, USA: Academic Press), 198–205. doi: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00019-4
- Corredig, M., and Dalgleish, D. G. (1998). Effect of Heating of Cream on the Properties of Milk Fat Globule Membrane Isolates. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2533–2540. doi: 10.1021/jf970944g
- Dam, S., Pagès, J.-M., and Masi, M. (2017). Dual regulation of the small RNA MicC and the quiescent Porin OmpN in response to antibiotic stress in *Escherichia coli*. *Antibiotics* 6:33. doi: 10.3390/antibiotics6040033
- Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., et al. (2008). Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal. Chem.* 80, 2921–2931. doi: 10.1021/ac702422x
- Del Canto, F., Botkin, D. J., Valenzuela, P., Popov, V., Ruiz-Perez, F., Nataro, J. P., et al. (2012). Identification of coli surface antigen 23, a novel Adhesin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 80, 2791–2801. doi: 10.1128/IAI.00263-12
- Douëllou, T., Delannoy, S., Ganet, S., Mariani-Kurkdjian, P., Fach, P., Loukiadis, E., et al. (2016). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dairy products — genetic diversity and virulence gene profiles. *Int. J. Food Microbiol.* 232, 52–62. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.032
- Douëllou, T., Galia, W., Kerangart, S., Marchal, T., Milhau, N., Bastien, R., et al. (2018). Milk fat globules hamper adhesion of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* to enterocytes: in vitro and in vivo evidence. *Front. Microbiol.* 9, 947. doi: 10.3389/fmicb.2018.00947
- Douëllou, T., Montel, M. C., and Thevenot, D. (2017). Invited review: anti-adhesive properties of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane-associated glycoconjugates against bacterial food enteropathogens. *J. Dairy Sci.* 100, 3348–3359. doi: 10.3168/jds.2016-11611
- EFSA and ECDC (2021). The European Union one health 2020 Zoonoses report. *EFSA J.* 19:e06971. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6971
- FAO and WHO (2018). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring 174
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, E., Glas, K., Oppegard, H., Raynaud, S., et al. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.* 162, 190–212. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008
- Galía, W., Mariani-Kurkdjian, P., Loukiadis, E., Blanquet-Diot, S., Leriche, F., Brugère, H., et al. (2015). Genome sequence and annotation of a human infection isolate of *Escherichia coli* O26:H11 involved in a raw Milk cheese outbreak. *Genome Announc.* 3, e01568–e01514. doi: 10.1128/genomeA.01568-14
- Hamadi, F., Latrache, H., Ghmari, A. E., Ellouali, M., and Mabrouk, M. (2004). Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ann. Microbiol.* 54, 213–225.
- Hamadi, F., Latrache, H., Zahir, H., Elghmari, A., Timinouni, M., and Ellouali, M. (2008). The relation between *Escherichia coli* surface functional groups' composition and their physicochemical properties. *Braz. J. Microbiol.* 39, 10–15. doi: 10.1590/S1517-83822008000100003
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., et al. (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 8, 11–22. doi: 10.1093/dnares/8.1.11
- Hazan, R., Que, Y.-A., Maura, D., and Rahme, L. (2012). A method for high throughput determination of viable bacteria cell counts in 96-well plates. *BMC Microbiol.* 12:259. doi: 10.1186/1471-2180-12-259
- Hoffmann, S., Walter, S., Blume, A.-K., Fuchs, S., Schmidt, C., Scholz, A., et al. (2018). High-throughput quantification of bacterial-cell interactions using virtual Colony counts. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 43. doi: 10.3389/fcimb.2018.00043
- Hong, Y., and Brown, D. G. (2008). Electrostatic behavior of the charge-regulated bacterial cell surface. *Langmuir* 24, 5003–5009. doi: 10.1021/la703564q
- Hritonenko, V., and Stathopoulos, C. (2007). OmpT proteins: an expanding family of outer membrane proteases in gram-negative Enterobacteriaceae (review). *Mol. Membr. Biol.* 24, 395–406. doi: 10.1080/09687680701443822
- Hwang, B.-Y., Varadarajan, N., Li, H., Rodriguez, S., Iverson, B. L., and Georgiou, G. (2007). Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpP. *J. Bacteriol.* 189, 522–530. doi: 10.1128/JB.101493-06
- Kim, J.-S., Lee, M.-S., and Kim, J. H. (2020). Recent updates on outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its potential reservoirs. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 273. doi: 10.3389/fcimb.2020.00273
- Kisiele, D. I., Chattopadhyay, S., Tcheshnokova, V., Paul, S., Weissman, S. J., Medenica, L., et al. (2013). Evolutionary analysis points to divergent physiological roles of type I fimbriae in salmonella and *Escherichia coli*. *MBio* 4, e00625–e00612. doi: 10.1128/mBio.00625-12
- Klodzińska, E., Szumski, M., Dziubakiewicz, E., Hryniewicz, K., Skwarek, E., Janusz, W., et al. (2010). Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation. *Electrophoresis* 31, 1590–1596. doi: 10.1002/elps.200900559
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., et al. (2020). Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA J.* 18:e05967. doi: 10.2903/j.efsa.2020.5967
- Krasowska, A., and Sigler, K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:112. doi: 10.3389/fcimb.2014.00112
- Lee, H., Padhi, E., Hasegawa, Y., Larke, J., Parenti, M., Wang, A., et al. (2018). Compositional dynamics of the Milk fat globule and its role in infant development. *Front. Pediatr.* 6:313. doi: 10.3389/fped.2018.00313
- Li, P., Lin, H., Mi, Z., Xing, S., Tong, Y., and Wang, J. (2019). Screening of polyvalent phage-resistant *Escherichia coli* strains based on phage receptor analysis. *Front. Microbiol.* 10:10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00850 | PMID: 31105661
- Liang, X., Liao, C., Thompson, M. L., Soupir, M. L., Jarboe, L. R., and Dixon, P. M. (2016). *E. coli* surface properties differ between stream water and sediment environments. *Front. Microbiol.* 7:7. doi: 10.3389/fmicb.2016.01732 | PMID: 27847507
- Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. V., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., et al. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* 44, 655–683. doi: 10.1093/femsre/fuz028
- Lopez, C. (2020a). "Intracellular origin of Milk fat globules, composition and structure of the Milk fat globule membrane highlighting the specific role of sphingomyelin," in *Advanced Dairy Chemistry, 2: Lipids*, eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox and J. A. O'Mahony (Cham: Springer International Publishing), 107–131. doi: 10.1007/978-3-030-48686-0_4
- Lopez, C. (2020b). Structure of the Milk Fat Globule Membrane: New Scientific Advances Revealing the Role of Sphingomyelin in Topographical and Mechanical Heterogeneities," in *Dairy Fat Products and Functionality: Fundamental Science and Technology*, eds. T. Truong, C. Lopez, B. Bhandari, and S. Prakash (Cham: Springer International Publishing), 41–66. doi: 10.1007/978-3-030-41661-4_3
- Lopez, C., Camier, B., and Gassi, J.-Y. (2007). Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *Int. Dairy J.* 17, 235–247. doi: 10.1016/j.idairy.2005.12.015
- Lamari, F., Khoadja, S., and Rtimi, S. (2018). Interaction of Vibrio to Biotic and Abiotic Surfaces: Relationship between Hydrophobicity, Cell Adherence, Biofilm Production, and Cytotoxic Activity. *Surfaces* 1, 187–201. doi: 10.3390/surfaces1010014
- Law, K.-Y. (2015). Water-surface interactions and definitions for hydrophilicity, hydrophobicity and superhydrophobicity. *Pure and Applied Chemistry (De Gruyter)*, 759–765. doi: 10.1515/pac-2014-1206

- Machado, S. G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M. C. D., De Block, J., et al. (2017). The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine Milk and dairy products. *Front. Microbiol.* 8:302. doi: 10.3389/fmicb.2017.00302
- Mariani-Kurkdjian, P., Denamur, E., Milon, A., Picard, B., Cave, H., Lambert-Zechovsky, N., et al. (1993). Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J. Clin. Microbiol.* 31, 296–301. doi: 10.1128/jcm.31.2.296-301.1993
- Martin, H. M., Hancock, J. T., Salisbury, V., and Harrison, R. (2004). Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infect. Immun.* 72, 4933–4939. doi: 10.1128/IAI.72.9.4933-4939.2004
- Mermod, M., Magnani, D., Solioz, M., and Stoyanov, J. V. (2012). The copper-inducible ComR (YcFQ) repressor regulates expression of ComC (YcFR), which affects copper permeability of the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biometals* 25, 33–43. doi: 10.1007/s10534-011-9510-x
- Miszczycza, S. D., Perrin, F., Ganet, S., Jamet, E., Tenenhaus-Aziza, F., Montel, M.-C., et al. (2013). Behavior of different Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in various experimentally contaminated raw-milk cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 150–158. doi: 10.1128/AEM.02192-12
- Murgiano, L., Timperio, A. M., Zolla, L., Bongiorno, S., Valentini, A., and Pariset, L. (2009). Comparison of Milk fat globule membrane (MFGM) proteins of Chianina and Holstein cattle breed Milk samples through proteomics methods. *Nutrients* 1, 302–315. doi: 10.3390/nu1020302
- Nachtigall, C., Weber, C., Rothenburger, S., Jaros, D., and Rohm, H. (2019). Test parameters and cell chain length of *Streptococcus thermophilus* affect the microbial adhesion to hydrocarbons assay: a methodical approach. *FEMS Microbiol. Lett.* 366:fnz150. doi: 10.1093/femsle/fnz150
- Obeid, S., Guyonarch, F., Francis, G., Guillemain, H., Wu, X., Pezennec, S., et al. (2019). The surface properties of milk fat globules govern their interactions with the caseins: role of homogenization and pH probed by AFM force spectroscopy. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 182:110363. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110363
- Ofek, I., Hasty, D. L., and Sharon, N. (2003). Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38, 181–191. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00228-1
- Ogura, Y., Ooka, T., Asadulghani Terajima, J., Nougayrède, J.-P., Kurokawa, K., (2007). Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biol.* 8:R138. doi: 10.1186/gb-2007-8-7-r138
- O'Riordan, N., Kane, M., Joshi, L., and Hickey, R. M. (2014). Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology* 24, 220–236. doi: 10.1093/glycob/cwt162
- Patel, J., Sharma, M., and Ravishakar, S. (2011). Effect of curli expression and hydrophobicity of *Escherichia coli* O157:H7 on attachment to fresh produce surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 110, 737–745. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04933.x
- Perna, N. T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., et al. (2001). Genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529–533. doi: 10.1038/35054089
- Pisanu, S., Ghisaura, S., Pagnozzi, D., Biosa, G., Tanca, A., Roggio, T., et al. (2011). The sheep milk fat globule membrane proteome. *J. Proteome* 74, 350–358. doi: 10.1016/j.jprot.2010.11.011
- Prasadarao, N. V., Wass, C. A., and Kim, K. S. (1996). Endothelial cell GlcNAc beta 1-4GlcNAc epitopes for outer membrane protein in enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* 64, 154–160. Available at: <https://iai.asm.org/content/64/1/154> (Accessed June 22, 2022).
- Prilipov, A., Phale, P. S., Koeunik, R., Widmer, C., and Rosenbusch, J. P. (1998). Identification and characterization of two quiescent porin genes, nmpC and ompN, in *Escherichia coli* BE. *J. Bacteriol.* 180, 3388–3392. doi: 10.1128/JB.180.13.3388-3392.1998
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., et al. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 664–698. doi: 10.1111/1574-6976.12030
- R Core Team (2021). R: a language and environment for statistical computing. Available at: <https://www.r-project.org/index.html>.
- Randall-Hazelbauer, L., and Schwartz, M. (1973). Isolation of the bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 116, 1436–1446. doi: 10.1128/jb.116.3.1436-1446.1973
- Rolhion, N., Carvalho, F. A., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). OmpC and the σE regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82. *Mol. Microbiol.* 63, 1684–1700. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05638.x
- Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29–33. doi: 10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x
- Ross, S. A., Lane, J. A., Kilooyne, M., Joshi, L., and Hickey, R. M. (2016). Defatted bovine milk fat globule membrane inhibits association of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with human HT-29 cells. *Int. Dairy J.* 59, 36–43. doi: 10.1016/j.idairyj.2016.03.001
- Sallmann, F. R., Bayeve-Descamps, S., Pattus, F., Salmon, V., Branza, N., Spik, G., et al. (1999). Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human Lactoferrin: BINDING CHARACTERISTICS AND BIOLOGICAL EFFECTS*. *J. Biol. Chem.* 274, 16107–16114. doi: 10.1074/jbc.274.23.16107
- Shaikh, N., Holt, N. J., Johnson, J. R., and Tarr, P. I. (2007). Fim operon variation in the emergence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: an evolutionary and functional analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 273, 58–63. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00781.x
- Sherlock, O., Schembri, M. A., Reisner, A., and Klemm, P. (2004). Novel roles for the AIDA Adhesin from Diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 186, 8058–8065. doi: 10.1128/JB.186.23.8058-8065.2004
- Sinclair, J. F., Dean-Nystrom, E. A., and O'Brien, A. D. (2006). The established Intimin receptor Tir and the putative Eucaryotic Intimin receptors Nucleolin and $\beta 1$ integrin localize at or near the site of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence to enterocytes in vivo. *Infect. Immun.* 74, 1255–1265. doi: 10.1128/IAI.74.2.1255-1265.2006
- Skeie, S. B., Håland, M., Thorsen, I. M., Narvhus, J., and Porcellato, D. (2019). Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: a moving goatpost challenging quality control. *J. Dairy Sci.* 102, 1959–1971. doi: 10.3168/jds.2017-14083
- Soudy, M., Anwar, A. M., Ahmed, E. A., Osama, A., Ezzeldin, S., Mahgoub, S., et al. (2020). UniproTR: Retrieving and visualizing protein sequence and functional information from Universal Protein Resource (UniProt knowledgebase). *J. Proteomics* 213:103613. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103613
- Sperandeo, P., and Polissi, A. (2016). Lipopolysaccharide transport to the cell surface: new insights in assembly into the outer membrane. *Structure* 24, 847–849. doi: 10.1016/j.str.2016.05.005
- Spitsberg, V. L. (2005). Invited review: bovine Milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *J. Dairy Sci.* 88, 2289–2294. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72906-4
- Subramanian, K., Shankar, R. B., Meenakshisundaram, S., Lakshmi, B. S., Williams, P. H., and Balakrishnan, A. (2008). Lamb-mediated adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J. Appl. Microbiol.* 105, 715–722. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03800.x
- Sun, X., and Wu, J. (2017). Food derived anti-adhesive components against bacterial adhesion: current progresses and future perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 69, 148–156. doi: 10.1016/j.tifs.2017.09.002
- The Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment (JEMRA) (2019). Hazard Identification and Characterization: Criteria for Categorizing Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on a Risk Basis. *J. Food Prot.* 82, 7–21. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-291
- Vallis, E., Ramsey, A., Sidiq, S., and DuPont, H. L. (2018). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*—a poorly appreciated enteric pathogen: systematic review. *Int. J. Infect. Dis.* 76, 82–87. doi: 10.1016/j.ijid.2018.09.002
- van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., and Zehnder, A. J. (1987). The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1893–1897.
- van Loosdrecht, M. C. M., Norde, W., Lyklema, J., and Zehnder, A. J. B. (1990). Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquat. Sci.* 52, 103–114. doi: 10.1007/BF00878244
- Verma, A., Ghosh, T., Bhushan, B., Packirisamy, G., Navani, N. K., Sarangi, P. P., et al. (2019). Characterization of difference in structure and function of fresh and mastitic bovine milk fat globules. *PLoS One* 14:e0221830. doi: 10.1371/journal.pone.0221830
- Vo, J. L., Ortiz, G. C. M., Subedi, P., Keerthikumar, S., Mathivanan, S., Paxman, J. J., et al. (2017). Autotransporter Adhesins in *Escherichia coli* pathogenesis. *Proteomics* 17:1600431. doi: 10.1002/pmic.201600431
- Witso, I. L., Benneche, T., Vestby, L. K., Nesse, L. L., Lönn-Stensrud, J., and Scheie, A. A. (2014). Thiophenone and furanone in control of *Escherichia coli* O103:H2 virulence. *Pathog. Dis.* 70, 297–306. doi: 10.1111/2049-632X.12128
- Yan, L. (2022). Package "ggvern." Available at: <https://github.com/yanlinlin82/ggvern> [Accessed April 15, 2022].
- Yoon, Y., Lee, S., and Choi, K.-H. (2016). Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control* 63, 201–215. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.11.013
- Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., et al. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26, 1608–1615. doi: 10.1093/bioinformatics/btq249
- Zita, A., and Hermansson, M. (1997). Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater in situ. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 299–306. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10443.x
- Zhang, X., Payne, M., Kaur, S., and Lan, R. (2022). Improved genomic identification, clustering, and serotyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using cluster/serotype-specific gene markers. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11: 772574. doi: 10.3389/fcimb.2021.772574
- Zhang, X.-S., Garcia-Contreras, R., and Wood, T. K. (2007). YcFR (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity. *J. Bacteriol.* 189, 3051–3062. doi: 10.1128/JB.01832-06

Chapitre 6

**Implication des protéines de
surface des STEC dans
l'association STEC-MFGMPs**

Article de recherche n°3

Bagel, A. *et al.*, Surface proteins of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* mediate association with milk fat globules in raw milk.

En préparation. Version non validée par les co-auteurs. Soumission prévue au dernier trimestre de 2022.

Les données supplémentaires sont présentées en Annexe 2. Par soucis de visualisation et de place, certains tableaux n'ont pas été intégrés au manuscrit.

1 **Title:** Surface proteins of Shiga toxin-producing *E. coli* mediate association with raw milk fat globule
2 membrane proteins

3 **Author names and affiliations:** A. Bagel¹, M. Bouvier², M. Canizares², B. Hamadou², L. Courcol¹, C.
4 Lopez³, V. Michel⁴, T. Douellou¹ and D. Sergentet^{1,2}

5 ¹ Université de Lyon, Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment Research Group, UMR5557
6 Ecologie Microbienne Lyon, CNRS (National Center of Scientific Research), VetAgro Sup, 69280 Marcy-
7 l'Etoile, France

8 ² Université de Lyon, VetAgro Sup—Campus Vétérinaire, Laboratoire d'Etudes des Microorganismes
9 Alimentaires Pathogènes—French National Reference Laboratory for *Escherichia coli* including Shiga
10 toxin-producing *E. coli* (NRL-STEC), 69280, Marcy-l'Etoile, France

11 ³INRAE, UR BIA, F-44316, Nantes, France

12 ⁴Actalia, 74800 La Roche-sur-Foron, France

13 * **Corresponding author:** Pr. Delphine Sergentet, delphine.sergentet@vetagro-sup.fr, +33478872599,
14 1 Avenue Bourgelat, VetAgro Sup, Marcy-L'Etoile, 69280, FRANCE

15

16 **Abstract**

17 By adhering to host cells and colonizing tissues, bacterial pathogens can successfully establish
18 infection. Considered the first step of the infection process, bacterial adhesion is now seen as a
19 promising strategy to prevent infectious diseases. Among the natural sources of anti-adhesive
20 molecules, the membrane of milk fat globules (MFGs) is of interest because of the diversity of proteins
21 and glycoconjugates anchored there. However, few studies have focused on the bacterial molecules
22 involved in inhibition of bacterial adhesion mediated by MFGs. In this context, we used three pathogenic
23 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains (O26:H11 str. 21765, O157:H7 str. EDL933, and
24 O103:H3 str. PMK5) as a model to evaluate whether STEC surface proteins are involved in the affinity
25 of STEC for milk fat globule membrane proteins (MFGMPs). The affinity of STEC for MFGMPs was
26 assessed indirectly by a natural raw milk creaming test and directly by an adhesion test. We showed
27 that free STEC surface proteins inhibit the concentration of the pathogen in the MFG-enriched layer in
28 a strain-dependent manner. Moreover, the OmpA and FliC proteins were identified within the protein
29 fraction of MFGMPs. Our results suggest that FliC participates in STEC adhesion to MFGMPs but other
30 STEC molecules may also participate. Overall, this study highlighted, for the first time, the involvement
31 of STEC surface proteins in the affinity for MFGs. The mechanism of STEC-MFG association is still not
32 fully understood but our results confirm the existence of receptor/ligand type interactions between the
33 bacteria and MFGs. Further studies are needed to identify and specify the molecules involved in this
34 interaction. These studies should take into account the likely involvement of several factors, including
35 adhesion molecules, and the diversity of each STEC strain.

36

37 **Keywords:** bacterial anti-adhesion, MFGMPs, STEC, flagellin, food

38

39 Introduction

40 Bacterial adhesion is the first step of infection. To effectively colonize hosts and cause symptoms,
41 pathogenic bacteria use adhesive strategies to attach to host cells (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006).
42 Adhesion is necessary so that microorganisms are not cleared by the host's natural defense
43 mechanisms. The bacterial adhesion process consists of a non-specific phase, involving
44 physicochemical bonds, and a specific phase involving molecular factors exposed on both host and
45 bacterial cell surfaces (Ofek et al., 2013). Inhibiting this step is a key strategy for infection control (Asadi
46 et al., 2019).

47 Prevention of bacterial adhesion is now considered a promising strategy to reduce the occurrence of
48 infectious diseases. Several specific approaches have been considered, including inhibition of adhesion
49 by membrane receptor analogs (Leonard et al., 2019). Several natural molecules contained in food,
50 especially milk components (Horemans et al., 2012; Douëllou et al., 2017b; Bagel and Sergentet, 2022),
51 could act as effective inhibitors of pathogen adhesion (Ofek et al., 2003, 2013; Sharon, 2006; Kahane
52 and Ofek, 2012; Orth and Krachler, 2013). Many studies have shown that the association of bacteria
53 with raw milk fat globules (MFGs) and raw milk fat could prevent the adhesion of several
54 enteropathogens to enterocytes through mimetic receptors (Douëllou et al., 2017b; Bagel and
55 Sergentet, 2022).

56 MFGs are present as triglyceride (TAG) microdroplets surrounded by a complex biological membrane,
57 called the milk fat globule membrane (MFGM), which ensures their integrity and individuality (Lopez and
58 Ménard, 2011). The MFGM is mainly composed of lipids (64 to 71.8%) and proteins (22.3% to 28%)
59 (Ortega-Anaya et al., 2022), of which approximately 10% are glycosylated (Ross et al., 2016). The
60 MFGM protein fraction shows similarities to that of intestinal cells (Jiménez-Flores and Brisson, 2008).

61 Among enteric bacteria responsible for foodborne infections, some strains of *Escherichia coli*, the Shiga-
62 toxin producing *E. coli* (STEC), are responsible for large-scale epidemics. STEC-related outbreaks have
63 been described in several countries, making this pathogen an international public health issue (FAO and
64 WHO, 2019). STEC are frequently associated with severe forms of infection such as hemorrhagic colitis
65 (HC). In very severe cases, STEC may cause systemic complications in the form of hemolytic uremic
66 syndrome (HUS), cerebral failure over several years, and in some cases, death of the patient. Children

67 and the elderly are most likely to develop HUS, which is the leading cause of renal failure in children. In
68 2010, there were more than 1.2 million cases of foodborne STEC infections, which caused 128 deaths
69 and nearly 13,000 Disability-Adjusted Life Years (DALYs) (WHO estimates of the global burden of
70 foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015, 2015).

71 Ruminants are the primary reservoir of STEC (Goyle, 2007). Despite the efforts and resources expended
72 by farms to control this pathogen, human infection is most often linked to ingestion of contaminated food
73 and water such as undercooked ground meat, raw milk cheese, or raw plant material. Nevertheless, raw
74 milk products are only a minor source of human enteric infection (EFSA and ECDC, (European Food
75 Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2019, 2021a; EFSA and
76 ECDC, 2021b). Interestingly, STEC prevalence data in dairy matrices and STEC outbreaks do not fit
77 overall foodborne-related outbreak figures (EFSA and ECDC, 2021b). Douellou et al. hypothesized that
78 this phenomenon might be related to an association between STEC and MFGs, which may inhibit STEC
79 adhesion to enterocytes (Douëllou et al., 2018). Bacterial affinity for MFGs and more specifically for the
80 MFGM is accepted for various bacterial species, particularly for lactic acid and propionic bacteria
81 (Brisson et al., 2010; Douëllou et al., 2017b; Gomand et al., 2018; Guerin et al., 2018).

82 To investigate this hypothesis, our team used the natural creaming of raw milk as a model. Natural
83 creaming can concentrate bacteria and bacterial levels in cream can be up to 500 times higher than in
84 milk (Anderson, 1909; Lamson, 1918). During creaming, MFGs spontaneously rise to the surface
85 because they have a lower density than the aqueous phase. This forms an MFG-concentrated layer,
86 called cream (Mulder and Walstra, 1974; Euber and Brunner, 1984; Bird, 1991). Previous studies from
87 our team showed that fifteen STEC strains, belonging to three key serotypes responsible for infection,
88 were recovered mainly from the cream layer after natural creaming (Douëllou et al., 2018; Bagel et al.,
89 2022a).

90 Furthermore, we showed that the concentration of STEC in the cream layer was dependent on the fat
91 level of the milk and the strain of bacteria (Bagel et al., 2022a). Microscopic observations showed that
92 *E. coli* cells were localized near MFGs, suggesting that MFGs could have a pivotal role in the
93 phenomenon of bacterial concentration (Bagel et al., 2022a). Such data suggested that STEC could
94 bind MFGs during natural creaming, probably through specific interactions between STEC surface
95 proteins and sugar epitopes attached to glycoproteins and glycolipids anchored in the MFGM. The type

96 of surface proteins exposed by different STEC strains and the glycosylated moieties recognized at the
97 MFGM could explain, in part, the strain-dependent difference in affinity for the cream layer.

98 Few data exist for *E. coli* and most published studies focus on the MFGM molecules recognized by
99 bacteria (Bagel and Sergentet, 2022). Very little data has been published on the bacterial molecules
100 involved in this association. We hypothesized that the concentration of STEC in the cream layer during
101 the natural creaming of raw milk is due to specific interactions between STEC surface proteins and
102 MFGM proteins. The aims of this study were: (1) to evaluate the involvement of STEC surface proteins
103 in the phenomenon of STEC concentration in raw milk cream and (2) to identify which STEC molecules
104 are involved in this phenomenon.

105 We used three highly pathogenic STEC strains of different serotypes (O157:H7, O26:H11, and
106 O103:H2) as model strains to investigate the role of STEC surface proteins in the affinity of STEC for
107 MFGM. For this purpose, we performed competitive creaming assays between STEC and free STEC
108 surface proteins and identified STEC surface proteins associated with the MFGM by proteomic analysis.
109 The role of the outer membrane protein A (OmpA) and the flagellin (FliC) in the STEC-MFGM association
110 was assessed by natural creaming and plate adhesion assay.

111 **Materials and Methods**

112 **Biological materials**

113 **Bacterial strains and culture conditions**

114 Three Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) (*E. coli* with *eae* and *stx* genes) were selected
115 from the French National Reference Laboratory (LMAP, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France) collection.
116 Bacteria were stored at -80°C in Brain Heart Infusion (BHI, BioMérieux, Marcy-L'Etoile, France)
117 supplemented with 15% glycerol. Bacteria were plated from glycerin-BHI frozen stock (-80°C) on LB
118 agar plates (Oxoid) and incubated at 37°C or 30°C for 16–18h. The day before each experiment, one
119 colony was picked from the plate and cultured overnight at 37°C or 30°C in BHI or BHI supplemented
120 with 100 µg.mL⁻¹ of ampicillin. Confirmed mutants were maintained on a medium without antibiotics.

121 **Table 1. Bacterial strains used in relevant studies.**

Strain	Description	Source or reference
DH5alpha	Non-pathogenic <i>E. coli</i> strain used for plasmid multiplication	(Datsenko and Wanner, 2000)
BW25141	Non-pathogenic <i>E. coli</i> strain used for plasmid multiplication	(Datsenko and Wanner, 2000)
EDL933 WT	Pathogenic STEC O157:H7 strain (<i>eae+</i> , <i>stx1+</i> , <i>stx2+</i>). ATCC 43895	(Perna et al., 2001)
EDL933/pKD46	EDL933-containing pKD46 used for λ Red recombination	This study
EDL933 Δ <i>ompA</i>	EDL933 with <i>ompA</i> gene deleted; Kan ^R	This study
EDL933 Δ <i>fliC</i>	EDL933 with <i>fliC</i> (flagellin) gene deleted; Kan ^R	This study
21765	Pathogenic STEC O26:H11 strain (<i>eae+</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2+</i>)	(Galia et al., 2015)
21765/pKD46	21765-containing pKD46 used for λ Red recombination	This study
21765 Δ <i>ompA</i>	21765 with <i>ompA</i> gene deleted; Kan ^R	This study
21765 Δ <i>fliC</i>	21765 with <i>fliC</i> (flagellin) gene deleted; Kan ^R	This study
PMK5	Pathogenic STEC O103:H2 strain (<i>eae+</i> , <i>stx1+</i> , <i>stx2+</i>)	(Mariani-Kurkdjian et al., 1993)
PMK5/pKD46	PMK5-containing pKD46 used for λ Red recombination	This study
PMK5 Δ <i>ompA</i>	PMK5 with <i>ompA</i> gene deleted; Kan ^R	This study
PMK5 Δ <i>fliC</i>	PMK5 with <i>fliC</i> (flagellin) gene deleted; Kan ^R	This study

122

123 **Plasmids**

124 The plasmid pKD4 was used as a template for PCR of the kanamycin resistant cassette. Plasmid pKD46
 125 encodes the Red genes (γ , β , *exo*) under the control of an arabinose-regulated promoter. It is also
 126 temperature-sensitive for easy curing at high temperatures (37–42°C) and expresses ampicillin
 127 resistance as a selection marker. The pKD4 and pKD46 plasmids were isolated from *E. coli* strains
 128 BW25141 and DH5alpha, respectively, from a 10mL overnight culture in BHI supplemented with 100
 129 μ g/mL ampicillin and incubated at 30°C. Plasmids were isolated with ChargeSwitch - Pro Plasmid
 130 Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA).

131

132 **Table 2. Plasmids used in this study.**

Plasmids	Description	Source or reference
pkD46	λ Red-expression under control of an arabinose-inducible promoter, temperature-sensitive, AmpR	(Datsenko and Wanner, 2000)
pkD4	Kan resistance gene cassette-containing plasmid; AmpR KanR	(Datsenko and Wanner, 2000)

133

134 **STEC surface protein extraction**

135 The extraction protocol for STEC surface proteins was performed as previously described
 136 (Bagel et al., 2022b). Briefly, bacterial stationary cultures (BHI, 37°C) were centrifuged at 5,000 g for 5
 137 min, washed twice in PBS (vol/vol), re-suspended in 100 μ L of PBS, heated at 60°C for 30 min, and
 138 centrifuged at 5,000 g for 5 minutes. Surface proteins from the supernatants were filtered through a 0.22
 139 μ m cellulose acetate microfiltration tube (Dutscher) at 13,000 g for 3 minutes to eliminate any remaining
 140 bacterial cells. Surface protein extracts were used immediately for downstream applications.

141 **Natural creaming assay of STEC in competition with STEC surface proteins**

142 Bovine raw milk was purchased either from the local market or directly from farms (Lyon and surrounding
 143 towns, France). Raw milk was stored at 4°C and used on the day of purchase.

144 **Effect of STEC surface protein concentration on STEC concentration factor in the cream layer**

145 To assess the ability of STEC surface proteins to inhibit STEC cell concentration in the cream layer, 10
 146 mL samples of raw milk were supplemented with a 10-fold range of concentrations of STEC surface
 147 proteins (the same strain), up to a final concentration in the product of an order of magnitude of 10²
 148 μ g.mL⁻¹. Supplemented raw milk was stored for 2 h at 4°C to allow the possible binding of STEC surface
 149 proteins to MFGM. Then, supplemented raw milk was contaminated at 6 log₁₀ CFU.mL⁻¹ with the same
 150 strain used as a protein supplementation source according to the OD₆₀₀/CFU.mL⁻¹ relation. This
 151 concentration was chosen because none of the strains saturated under this condition according to our
 152 previous study (Bagel et al., 2022a). We collected 100 μ L from each *E. coli*-contaminated milk, then
 153 serially diluted the aliquots in PBS (Oxoïd, Thermo Fisher Scientific) and immediately plated them in
 154 duplicate on Luria Bertani (LB) agar plates (Oxoïd, Thermo Fisher Scientific). Plates were incubated for

155 18–24h at 37°C and colonies were counted. Supplemented and inoculated raw milk was placed at 4°C
156 for 16–24h to allow natural cream separation (creaming). We collected 100 µL of the cream layer in
157 each tube and STEC was enumerated as described above for raw milk.

158 **Evaluation of the specificity of STEC protein extracts for STEC inhibition in the cream layer**
159 **(crossing assay)**

160 Strain-specific inhibition was evaluated for each strain by crossing the origin of the protein extracts as a
161 supplementation source. For this purpose, 10 mL samples of raw milk were supplemented with STEC
162 surface proteins from each strain to a final concentration of 0.20 µg.mL⁻¹ as described previously. After
163 2 h at 4°C, supplemented-raw milk was inoculated at 6 log¹⁰ CFU.mL⁻¹ with each STEC strain. The
164 experiments were then completed as previously described. The concentration factor (CF) of STEC in
165 the cream layer was calculated as the following formula:

166
$$CF = \log_{10}(\text{Concentration of STEC in Raw Milk}) - \log_{10}(\text{Concentration of STEC in Cream})$$

167 **Identification of STEC proteins associated with the MFGM**

168 **Extraction of STEC proteins associated with the MFGM**

169 For each strain, 10 mL of bovine raw milk was supplemented with 100 µL of STEC protein extract
170 containing 1 mg of protein material, gently homogenized by turning over, and then natural creaming was
171 performed at 4°C for 16h–18h. As a control, 100 µL of PBS was used in place of the STEC surface
172 proteins. The next day, 600 µL of the cream layer was suspended in 1.4 mL of 50% sucrose solution
173 (phosphate buffer, pH = 6.8) and heated at 40°C for 5 min. MFGs were washed as described in (Patton
174 and Huston, 1986) to eliminate STEC proteins that did not adhere. Each heated cream sample was
175 placed at the bottom of a 15 mL conical centrifuge tube (Falcon, Corning Life Sciences, Hazebrouck,
176 France) filled with 8 mL of a 5% sucrose solution and centrifuged for 20 min at 1600 g (Sorvall ST 16R
177 centrifuge, Thermo Fisher Scientific). MFGM proteins and STEC proteins associated with the MFGM
178 were extracted as described in (Cebo et al., 2010) with some modifications. Washed MFGs were
179 suspended in 200 µL of denaturing buffer (63 mM Tris-HCl, 2% SDS, pH 6.8) supplemented with EDTA-
180 free Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete Mini, Merck) at the concentration recommended by the
181 manufacturer. Samples were incubated for 1 h at 20 ± 1°C with occasional vortexing and then

182 centrifuged for 10 min at 10,000 *g*. The aqueous phase containing extracted proteins was recovered
183 and quantified with the Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Pierce™ Thermo Fisher Scientific). The
184 samples were stored at -20°C until proteomic analyses were performed.

185 **Label-free relative quantification of STEC proteins associated with the MFGM**

186 Approximately 40 µg of supplied proteins were prepared following instructions from the easyPep kit from
187 Thermo Fisher Scientific. Samples were reduced and alkylated for 10 min at 95°C and then digested
188 with LysC/Trypsin at a 1:10 ratio for 3 h at 37°C. Samples were then purified on the easyPep kit spin
189 columns, dried, and taken up in 50 µL 0.1% formic acid. The samples were then assayed by a
190 fluorometric assay.

191 The same quantity of each sample was analyzed on a high-resolution orbitrap mass spectrometer in
192 TOP20 HCD mode. MS data were reprocessed with Proteome Discoverer 2.4 software (Thermo Fisher
193 Scientific) with the Sequest HT search engine against (i) the total UniProt *E. coli* database (862,106
194 entries; October 2021), (ii) UniProt *Bos Taurus* database (37,539 entries; November 2021), and (iii) the
195 proteomic sequences of the three STEC strains obtained from genomic sequences via NCBI Prokaryotic
196 Genome Annotation Pipeline (PGAP) (EDL933: 5,425 entries; 21765: 5,361 entries; PMK5: 1,994
197 entries) as well as the addition of a contaminant database, filtered at a false positive rate of 1%.
198 Quantification ratios between conditions were calculated by pairwise comparison and t-test directly in
199 Proteome Discoverer software.

200 Further analyses were performed in 'R' (R Core Team, 2021) and the Venn diagrams were realized with
201 'ggvenn' (Yan, 2022). To identify proteins associated with the STEC extract, proteins identified by
202 MS/MS were filtered according to two conditions: (i) proteins were annotated to the *Escherichia coli*
203 species and (ii) proteins were absent from the three biological replicates of samples not supplemented
204 with surface proteins (PBS). Strain-specific differentially expressed proteins (DEPs) were extracted
205 based on the values of the log₂ abundance ratio < -1 or > 1 (according to the order of the ratio) and a
206 p-value < 0.05, against the other two strains. For poorly annotated proteins, a homologous protein
207 (>90%) was used to predict function and subcellular location.

208

209 **Bacterial mutant construction**

210 The λ red system, adapted from Datsenko and Wanner (2000), was used to make isogenic knockouts
211 (KOs). Gene KOs were replaced with the kanamycin (Kan) resistance cassette from pKD4 by
212 homologous recombination.

213 **Overlapping DNA amplicons**

214 The Kan resistance cassette was amplified by overlap PCR from the template plasmid pKD4 and hybrid
215 primers. Primers were synthesized (Thermo Fisher Scientific) with 20 nucleotides of pKD4 priming sites
216 and with 50 nucleotides from each side of the target genes (**Supplementary Table S1**). Extension of
217 overlapping DNA amplicons was performed in a CFX96 PCR system (BioRad, Marnes-la-Coquette,
218 France) with the following program: an initial denaturation of 30 sec at 98°C; then 35 cycles of 10 sec
219 at 98°C, 30 sec at 56°C, and 120 sec at 72°C. The PCR products were purified with the Wizard SV Gel
220 and PCR Clean-Up System (Promega), digested with DpnI (Thermo Fisher Scientific), re-purified, and
221 finally suspended in sterile DNase-free water.

222 **Bacterial transformation**

223 Target strains were transformed with pKD46 by electroporation. On the day of each experiment,
224 overnight cultures were diluted (1:1,000) in 40 mL of LB and cultured at 37°C until reaching an OD_{600} of
225 ≈ 0.5 . Bacterial cultures were centrifuged for 5 min at 5,000 *g* and washed twice with ice water,
226 decreasing the volume by half between each wash. Finally, washed bacterial cell pellets were re-
227 suspended in 400 μ L of ice water supplemented with 15% glycerol. Electroporation was performed using
228 the Gene Pulser system (BioRad) with the following parameters: 2.5 kV; 25 μ F; and a 0.20-cm cuvette
229 (BioRad) filled with 20 μ L of competent bacterial cells and 1–5 μ L purified pKD46 (≈ 10 –100 ng). One
230 milliliter of warmed LB (37°C) was instantly added to the shocked cells and transformants were
231 recovered 1–2 h at 37°C. One-half of the recovery culture (0.5 mL) was centrifuged for 5 min at 5,000
232 *g*, re-suspended in 0.1 mL of LB, and spread onto LB agar supplemented with 100 μ g.mL⁻¹ of ampicillin
233 (Thermo Fisher Scientific) to select transformants. Transformants were checked by PCR and stocked
234 as previously described at -80°C in BHI-glycerol.

235 For isogenic KO, transformants carrying pKD46 were made electrocompetent and transformed as
236 previously described except that fresh cultures were realized in LB supplemented with 100 µg.mL⁻¹ of
237 ampicillin and 1mM L-arabinose and cultured at 30°C with gentle agitation. For electroporation, 1–10 µL
238 of overlapping PCR amplicon containing 10–100 ng of DNA material was used. Bacterial cells that had
239 undergone homologous recombination were recovered on LB agar supplemented with 50 µg.mL⁻¹ of
240 kanamycin (Sigma Aldrich). Insertion of the Kan resistant cassette was checked by two PCRs upstream
241 and downstream of the target gene. The loss of pKD46 was confirmed by an ampicillin sensitivity test.
242 Enzymatic digestion and amplicon sequencing were performed to confirm disruption of target genes.

243 **Impact of STEC gene deletions on saturation of the cream layer of raw milk by** 244 **natural creaming**

245 Natural creaming assays were performed as previously described in (Bagel et al., 2022a) with some
246 modifications. Briefly, for each *E. coli* strain, an adequate volume of overnight bacterial suspensions,
247 containing approximately 3×10^9 CFU according to the OD₆₀₀/CFU.mL⁻¹ relation, was centrifuged for 5
248 min at 5,000 *g* using a Sorvall ST 16R centrifuge (Thermo Fisher Scientific). The pellets were suspended
249 in 10 mL of bovine raw milk to obtain a final concentration of approximately 8.5 log₁₀ CFU.mL⁻¹. Three
250 different milks were used and contaminated with independent STEC cultures. A series of 10-fold
251 dilutions was performed in raw milk to obtain four 9 mL samples contaminated with different
252 concentrations of STEC. The STEC concentration in raw milk was checked by the microdilution method
253 as described in (Baron et al., 2006) with some modifications. We sampled 100 µL of each contaminated
254 milk and first diluted it in 900 µL of PBS. After intense vortexing, these aliquots were placed in a sterile
255 96-well microplate (Greiner) and 10-fold dilutions in PBS were performed. For each dilution, 20 µL was
256 immediately dropped twice in a 24-well plate containing 1 mL of Luria Bertani (LB) agar. Once the drops
257 were absorbed, the plates were incubated for 18–24 h at 37°C. The STEC concentration was estimated
258 from wells containing 15–50 colonies. Raw milk suspensions were placed at 4°C for 16–24h to allow
259 natural cream separation (creaming). After creaming, the volume of the cream layer was evaluated by
260 reading directly on the tube and STEC count in cream was evaluated by the microdilution method as
261 previously described. The saturation concentration (SC) was evaluated by non-linear regression as
262 previously described (Bagel et al., 2022a).

263 **Impact of STEC gene deletions on capacity to adhere to MFGMPs**

264 This experiment was performed as previously described (Bagel et al., 2022b). Briefly, 96-well plates
265 (Nunc MaxiSorp plate, Thermo Fisher Scientific) were coated overnight at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ with 100 μL of
266 MFGMP solutions at 100, 25, 6.25, 1.56, 0.39, or 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. After intensive washing, plates were blocked
267 for 2 h at the same temperature with 250 μL of 5% Tween 20-phosphate buffer. The bacterial adhesion
268 step was fixed for 2 h at 4°C in static conditions with 100 μL of PBS-washed STEC culture calibrated at
269 $8 \log_{10}$ CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$. Plates were washed intensively to remove non-adherent bacteria. The number of
270 adherent STEC cells was estimated by the growth delay. Bacterial growth was initiated with the addition
271 of 100 μL of LB medium to each well. Plates were incubated in a plate reader (Spark, Tecan) inside a
272 large humidity cassette at 37°C and the absorbance at 600 nm was measured every 5 min for 15 h. For
273 each growth curve, a 5-parameter log-logistic fit was used to estimate the time (in seconds) to reach a
274 0.02 absorbance threshold (Tt; Time Threshold).

275 **Data processing and statistical analysis**

276 Data processing and statistical analysis were performed in R software (R Core Team, 2021). The normal
277 distribution and homogeneity of the data and, if necessary, the residuals of the models, were checked
278 graphically and statistical tests such as the Shapiro-Wilk, Levene, and Barlett tests were performed.
279 Depending on the results of these tests, one-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests were used to
280 statistically evaluate the differences between groups. Multiple pairwise comparisons were realized with
281 the Tukey method and Dunn's test (p-values were adjusted with Holm's method) for parametric and non-
282 parametric tests, respectively. For the natural creaming assay of STEC in competition with STEC
283 surface proteins, the median effective dose (ED₅₀) was estimated with the R "drc" package (Ritz et al.,
284 2015). For this purpose, the concentration factor (CF) was log₂-transformed and a dose-response model
285 (log-logistic model at four parameters) was used. To evaluate the impact of gene KO on MFGMP
286 adhesion, linear regressions with interaction terms for each type of strain were performed with the R
287 "stats" package. To bypass the infinite value induced by log transformation, the concentration of the
288 MFGMP solution (independent variable) was expressed as $\log(X+1)$. For all statistical tests, a p-value
289 ≤ 0.05 was considered significant. When necessary, the 95% confidence interval (CI) of the estimated
290 model parameters was indicated in the following sections as follows: [lower bound; upper bound].

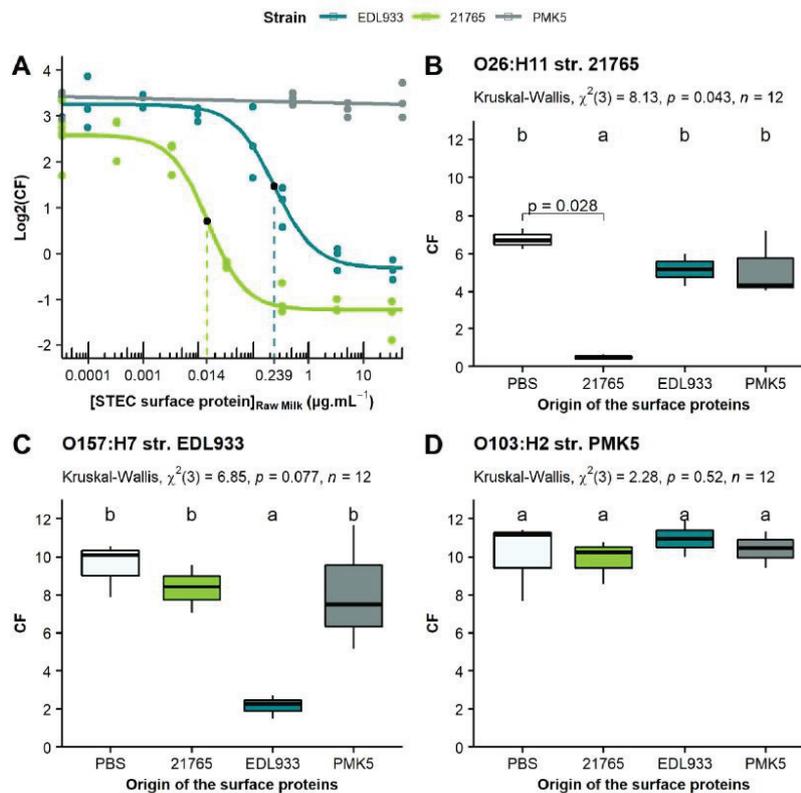
291 Results

292 Strain-specific inhibition of STEC concentration in the cream layer by STEC 293 surface proteins

294 Addition of STEC surface proteins to raw milk decreased the concentration of STEC in the cream
295 layer (**Figure 1A**). STEC concentration in cream as a function of added protein concentration displayed
296 a dose-response type curve for O157:H7 str. EDL933 and O26:H11 str. 21765. For both strains, a
297 distinct median effective dose (ED_{50}) was estimated at $0.014 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with a 95% CI [0.01; 0.02] for
298 O26:H11 str. 21765 and $0.24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with a 95% CI [0.13; 0.35] for O157:H7 str. EDL933 (**Table 3**).
299 The concentration factor of STEC in the cream layer (CF) was calculated using the inverse log₂ function
300 from the estimated parameters of dose-response models. When STEC surface proteins were not added
301 (**Table 3**; parameter c), STEC cells were concentrated 6.24 fold with a 95% CI [5.12; 7.60] and 9.47 fold
302 with a 95% CI [8.01; 11.21] in cream for O26:H11 str. 21765 and O157:H7 str. EDL933, respectively,
303 compared with the initial concentration in raw milk ($6 \log_{10} \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$). Although, with the highest
304 concentration of surface proteins (**Table 3**; parameter d), the concentration of STEC in the cream was
305 less accurate. O157:H7 str. EDL933 displayed a CF of 0.81 with a 95% CI [0.61; 1.07] and O26:H11 str.
306 21765 had a CF of 0.43 with a 95% CI [0.35; 0.52].

307 Furthermore, inhibition of STEC concentration in cream was only observed when surface proteins of the
308 same strain were initially added to raw milk (**Figure 1A and 1B**). A parametric test showed significant
309 differences for O26:H11 str. 21765 and O157:H7 str. EDL933 (group 'a'; **Figure 1B and 1C**). Due to the
310 low number of data points, we also performed a non-parametric test, and a difference was only observed
311 for O26:H11 str. 21765 between control (PBS) and when O26:H11 str. 21765 surface proteins were
312 added (p -value = 0.028). In contrast, no inhibitory effects of the surface proteins from O103:H2 str.
313 PMK5 were observed in the PMK5 strain itself (**Figure 1A**) or in the other two strains (**Figure 1D**).

314



315

316 **Figure 1. Natural creaming assay of STEC in competition with free STEC surface proteins. (A)** Effect of STEC
 317 surface protein supplementation in raw milk ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on the concentration factor of STEC in the cream layer (CF).
 318 Raw milk was incubated for 2 h at 4°C with increasing concentrations of STEC surface proteins from STEC str.
 319 21765, str. EDL933, or str. PMK5. Then, raw milk was supplemented at $6 \log_{10} \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ with intact STEC cells
 320 corresponding to the same strain used for protein supplementation. CF of STEC was \log_2 -transformed and the final
 321 concentration of STEC surface proteins in raw milk is represented in a \log_{10} scale. Black points represent the median
 322 effective dose (ED_{50} in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of each dose-response curve. The effect of the strain origin of surface proteins on
 323 the concentration of STEC str. 21765 (**B**), EDL933 (**C**), and PMK5 (**D**) in cream is presented on the corresponding
 324 panels. Raw milk was supplemented with STEC surface protein at a final concentration of $0.20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and then
 325 inoculated individually at $6\text{-}\log_{10} \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ with each STEC strain. Both experiments were performed in triplicate
 326 with independent bacterial cultures ($n=3$). The colors represent the different strains. The control condition (+PBS)
 327 is shown in light blue. Groups (a and b) were defined for $p < 0.051$ according Tukey test pairwise comparisons.

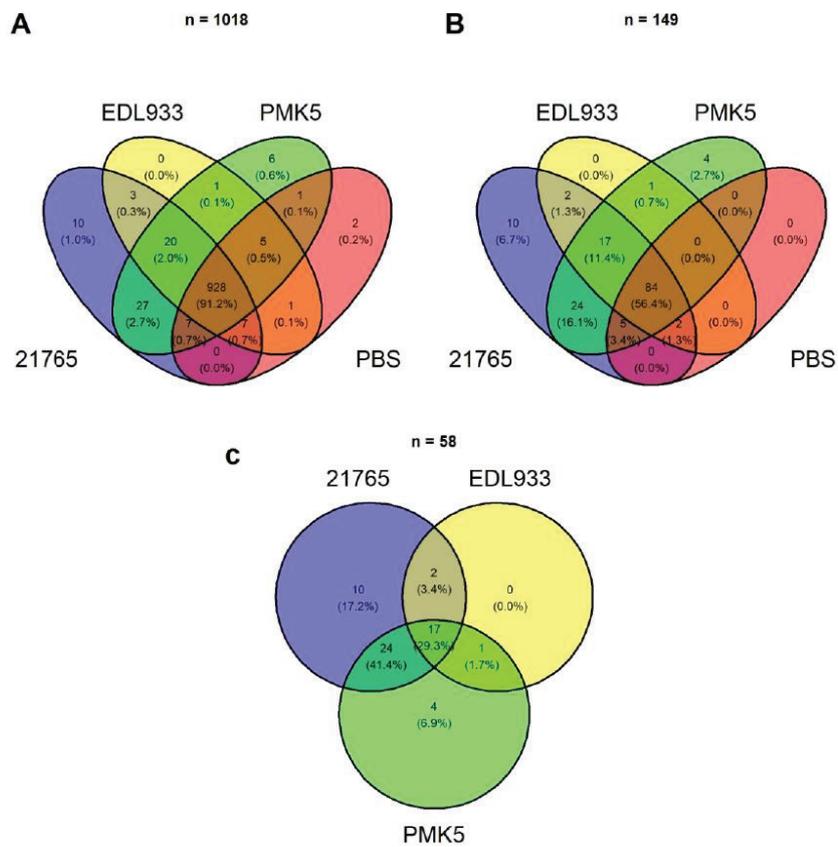
328 **Table 3. Estimation of the coefficients of the log-logistic regressions (dose-response) of the natural**
 329 **creaming assay of STEC in competition with free STEC surface proteins.**

	O26:H11 str. 21765				O157:H7 str. EDL933			
	b	c	d	e	b	c	d	e
Estimate	1.23	-1.22	2.64	0.014	1.18	-0.31	3.25	0.24
CI95%	[0.63; 1.84]	[-1.515; -0.931]	[2.36; 2.93]	[0.01; 0.02]	[0.39; 1.97]	[-0.72; 0.09]	[3.00; 3.49]	[0.13; 0.35]
Std.	0.29	0.14	0.14	0.00	0.38	0.19	0.12	0.05
Error	4.28	-8.73	19.38	4.09	3.13	-1.60	27.95	4.66
t-value	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.13	< 2.2e-16	0.00
p-value	***	***	***	***	**		***	***

330 b: the slope at the median effective dose (ED₅₀); c: the lower limit of the curve; d: the upper limit of the
 331 curve; e: the median effective dose (ED₅₀). *** p-value ≤ 0.001; ** p-value ≤ 0.01

332 **STEC surface proteins associated with the MFGM**

333 By mass spectrometry, 1,042 proteins were identified regardless of the sample (n=12), including 869
 334 proteins associated with *Bos taurus*, 149 proteins associated with *Escherichia coli*, and 24 proteins from
 335 the contaminant library (**Supplementary Table S1**). Approximately 91.2% of identified proteins (928)
 336 were common to all samples (**Figure 2A**). Among the 149 proteins associated with *Escherichia coli*
 337 (**Figure 2B**), only 58 proteins were specific to the samples supplemented with STEC protein extract
 338 (**Figure 2C**). A list of all proteins associated with *Escherichia coli* is available in **Supplementary Table**
 339 **S1**. Among the 58 proteins specific to the STEC protein-supplemented samples, only 34 proteins were
 340 differentially expressed between the strains (DEPs) (≥ 2-fold and p-value ≥ 0.05): 21 DEPs were
 341 associated with O26:H11 str. 21765, 12 with O103:H3 str. PMK5, and 1 with O157:H7 str. EDL933
 342 (**Table 4**). A large majority of the identified *Escherichia coli* proteins were predicted to be cytoplasmic,
 343 including ribosomal proteins, transcription factors, and enzymes, while four unique proteins (OmpA,
 344 OmpN, FliC, and FadL) were related to surface localization (**Table 4**). Further experiments focused only
 345 on OmpA and FliC.



346

347 **Figure 2. *E. coli* proteins identified by MS/MS.** Venn diagram illustrating (A) total and (B) *E. coli*-specific proteins
 348 identified in protein extracts of MFGMPs from raw milk enriched with STEC surface proteins (O26:H11 str. 21765,
 349 O157:H7 str. EDL933, or O103:H2 str. PMK5) or control (PBS). Sample-specific *E. coli* proteins enriched in STEC
 350 surface proteins are presented in panel (C).

351 Table 4. Relative quantification of STEC proteins associated with the MFGM protein fraction.

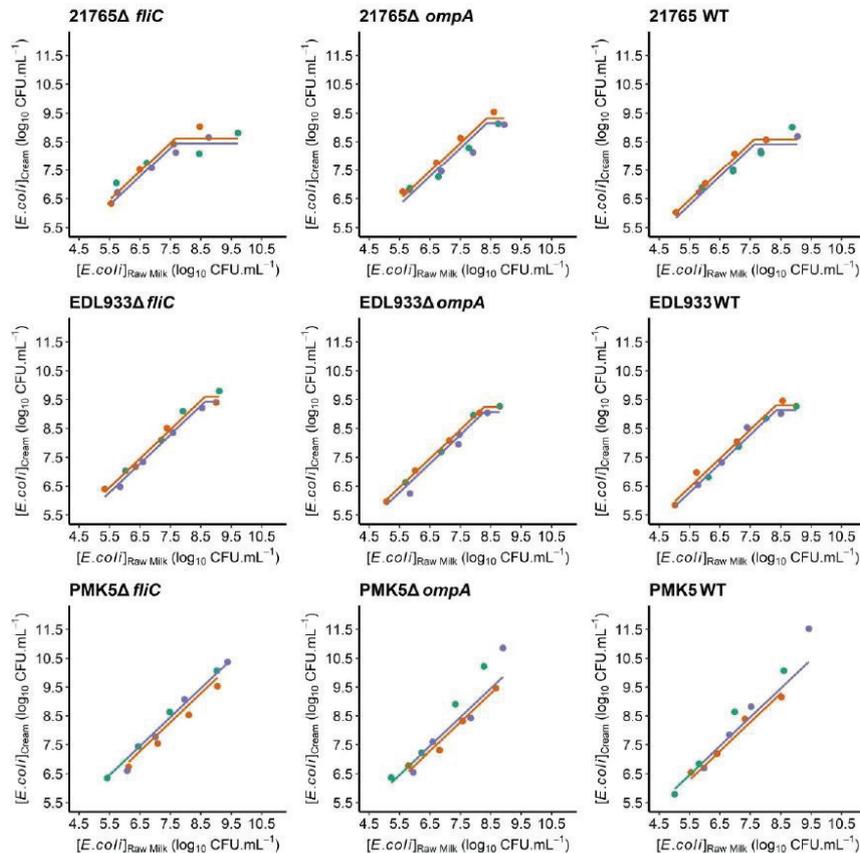
Accession	Accession homologous	Protein names	PSM	Localization	Absence / presence			Log2 Ratio (p-value)		
					21765	EDL933	PMK5	21765/ PMK5	21765/ EDL933	EDL933/ PMK5
DEPs in O26:H11 str. 21765 (n=21)										
A0A7B4KCG4	Q3Z601	Heat shock 70 kDa protein	113	Cytoplasmic	+	-	+	1,29 (4,50E-03)	6,64 (1,00E-17)	-6,64 (1,00E-17)
A0A4C9D1M4	-	50S ribosomal protein L7/L12	24	Cytoplasmic	+	-	+	1,54 (9,01E-04)	6,64 (1,00E-17)	-6,64 (1,00E-17)
A0A2T1LE41	-	Elongation factor G (EF-G)	11	Cytoplasmic	+	-	-	6,64 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)	-
A0A783S9P7	B7NDU8	Elongation factor G (EF-G)	10	Cytoplasmic	+	-	+	1,31 (4,02E-03)	6,64 (1,00E-17)	-6,64 (1,00E-17)
A0A6M0PNN9	A9N0J3	50S ribosomal protein L7/L12	10	Cytoplasmic	+	-	-	6,64 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)	-
Q1R7A8	-	Fructose-bisphosphate aldolase (FBP aldolase)	5	Cytoplasmic	+	-	+	1,32 (3,90E-03)	6,64 (1,00E-17)	-6,64 (1,00E-17)
A0A6M0PFC9	A0A1B7K6Y0	50S ribosomal protein L5	3	Cytoplasmic	+	-	+	1,23 (6,64E-03)	6,64 (1,00E-17)	-6,64 (1,00E-17)
A0A7I6R742	P0A9Q7	Bifunctional aldehyde-alcohol dehydrogenase AdhE	2	Cytoplasmic	+	-	-	6,64 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)	-
Q8XEB8	-	Isochorismatase domain-containing protein	1	Cytoplasmic	+	+	-	6,64 (1,00E-17)	2,33 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)
F4TL18	-	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	1	Cytoplasmic	+	+	+	1,65 (4,00E-04)	1,22 (3,82E-03)	0,43 (3,81E-01)
A0A377DM26	-	50S ribosomal protein L4	1	Cytoplasmic	+	+	+	1,81 (1,12E-04)	2,08 (1,45E-08)	-0,26 (9,89E-01)
A0A5C9AEQ4	-	Cysteine synthase (Fragment)	1	Cytoplasmic	+	-	-	6,64 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)	-
A0A1M2TW09	-	Trigger factor (TF)	1	Cytoplasmic	+	-	-	6,64 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)	-
A0A5P0ZBF6	A0A8F3FHV1	NAD(P)H dehydrogenase	1	Cytoplasmic	+	-	-	6,64 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)	-
A0A7X1MK38	-	Dihydropyridyl dehydrogenase	1	Cytoplasmic	+	-	+	1,56 (7,72E-04)	6,64 (1,00E-17)	-6,64 (1,00E-17)
A0A6M0PNA7	-	Transaldolase	1	Cytoplasmic	+	-	-	6,64 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)	-
A0A4C9WKT1	-	Glucose-6-phosphate isomerase	1	Cytoplasmic	+	-	-	6,64 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)	-
A0A0B1MZJ0	-	Protein ElaB	5	CytoplasmicMembrane	+	-	+	2,65 (3,66E-08)	6,64 (1,00E-17)	-6,64 (1,00E-17)
A0PCV7	A0PCV7	Flagellin (Flc)	1	Extracellular	+	-	-	6,64 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)	-
A0A1X3J431	-	Outer membrane protein A (OmpA)	62	OuterMembrane	+	+	+	1,77 (1,52E-04)	6,63 (1,00E-17)	-4,86 (1,00E-17)
A0A0A0FCD2	-	Long-chain fatty acid transport protein (FadL)	1	OuterMembrane	+	-	-	6,64 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)	-
DEPs in O103:H3 str. PMK5 (n=12)										
A0A3Y1QZA3	-	Chaperonin GroEL	63	Cytoplasmic	+	+	+	-1,16 (4,69E-02)	0,57 (5,02E-03)	-4,02 (1,00E-17)
A0A140NF01	-	Transcription termination factor Rho	6	Cytoplasmic	+	+	+	-2,59 (1,46E-06)	-0,54 (1,52E-01)	-2,15 (1,05E-02)
A0A6M0PDM3	A0A1B7JZZ4	Ribosome-binding ATPase YchF	5	Cytoplasmic	+	-	+	-1,84 (8,74E-04)	6,64 (1,00E-17)	-6,64 (1,00E-17)
A0A6N7NAY3	A0A059UV59	50S ribosomal protein L15	5	Cytoplasmic	+	+	+	-3,11 (5,33E-09)	0,09 (7,98E-01)	-3,4 (3,71E-09)
A0A6M0Q291	-	Uracil phosphoribosyltransferase	4	Cytoplasmic	+	-	+	-2,14 (8,53E-05)	6,64 (1,00E-17)	-6,64 (1,00E-17)
A0A6N7NHK1	Q11FW5	50S ribosomal protein L4	4	Cytoplasmic	+	+	+	-2,53 (2,65E-06)	-0,28 (4,29E-01)	-2,45 (3,14E-04)
D6I1F1	A0A376TSQ8	Translation initiation factor IF-2	3	Cytoplasmic	+	+	+	-2,03 (2,13E-04)	-0,22 (5,38E-01)	-2,32 (5,47E-03)
A0A6N7NGA0	-	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase	1	Cytoplasmic	-	-	+	-6,64 (1,00E-17)	0,00E+00	-6,64 (1,00E-17)

Accession	Accession homologous	Protein names	PSM	Localization	Absence / presence			Log2 Ratio (p-value)		
					21765	EDL933	PMK5	21765/PMK5	21765/EDL933	EDL933/PMK5
A0A6D1A8Y1	-	F0F1 ATP synthase subunit beta (Fragment)	5	CytoplasmicMembrane	-	-	+	-6,64 (1,00E-17)	-	-6,64 (1,00E-17)
F4NDT5	-	Outer membrane protein N	33	OuterMembrane	-	+	+	-6,64 (1,00E-17)	-6,64 (1,00E-17)	-3,68 (3,85E-11)
A0A1X3J1X3	-	Bacteriophage Mu tail sheath protein (GpL)	3	Other (Phage)	-	-	+	-6,64 (1,00E-17)	-	-6,64 (1,00E-17)
A0A2X9QJ57	-	Head protein (Putative phage major head subunit)	1	Other (Phage)	-	-	+	-6,64 (1,00E-17)	-	-6,64 (1,00E-17)
DEPs in O157:H7 str. EDL933 (n=1)										
A0A4T8WWM6	A0A0H3JH81	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I	1	Cytoplasmic	+	+	-	6,64 (1,00E-17)	-2,25 (1,00E-17)	6,64 (1,00E-17)

352 PSM: peptide spectrum matches. A protein was considered present if a unique peptide was detected in at least one
353 sample of the triplicates. Relative quantification, indicated by the log2 ratio and associated p-value (t-test), refined
354 the comparison between strains by showing their difference in expression. A homologous protein (>90%) was used
355 to predict function and subcellular localization if necessary.

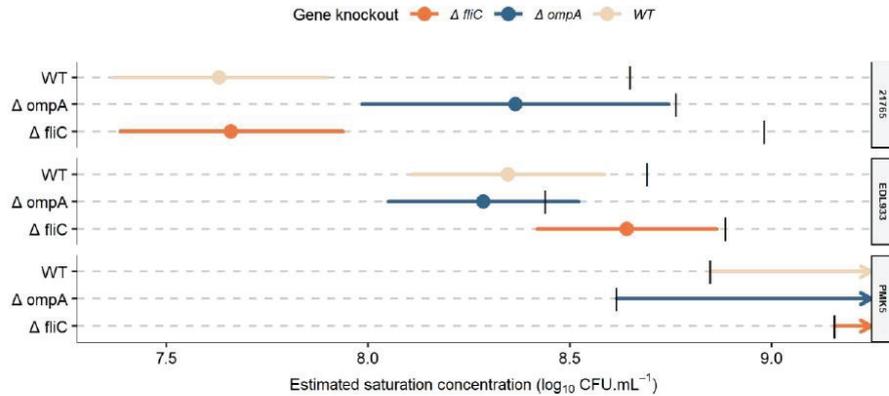
356 Impact of STEC gene knockout on the saturation of the cream layer saturation 357 by natural creaming

358 The concentration of STEC and their derived mutants in the cream layer was $\sim 1 \log_{10}$ CFU.mL⁻¹ greater
359 than the initial enrichment level (Figure 3). STEC strains were mainly recovered in the cream layer when
360 the bacterial level in raw milk ranged from 5 to 7.5 \log_{10} CFU.mL⁻¹ or from 5 to 8.5 \log_{10} CFU.mL⁻¹,
361 depending on the strain (Figure 3). However, at higher inoculum levels—7.5 or 8.5 \log_{10} CFU.mL⁻¹—the
362 concentration of *E. coli* in the cream was limited; the cream layer appeared saturated by STEC. The
363 estimated SC were between 7.63 and 8.64 \log_{10} CFU.mL⁻¹ (min; max) (Figure 4). Deletion of the *ompA*
364 gene significantly altered the concentration of STEC in the cream for O26:H11 str. 21765. The SC of
365 O26:H11 str. 21765 $\Delta ompA$ was estimated at 8.36 \log_{10} CFU.mL⁻¹ with a 95% CI [7.98; 8.74], while the
366 WT strain (control) reached saturation of the cream layer at a concentration of 7.63 \log_{10} CFU.mL⁻¹ with
367 a 95% CI [7.37; 7.90] (Figure 3). In contrast, O26:H11 str. 21765 $\Delta flhC$ presented a profile similar to the
368 WT strain, saturating the cream layer at an SC estimated at 7.66 with a 95% CI [7.38; 7.93]. The derived
369 strains from O157:H7 EDL933 displayed no significant difference in SC compared with the WT strain.
370 All SC were estimated between 8.05 and 8.86 (the min and the max of lower and upper bounds of the
371 95% CI). For the strains associated with O103:H2 str. PMK5, the model could not estimate the SC due
372 to the lack of a point in the saturation phase, which would result in an SC higher than the highest
373 concentration assayed.



375

376 **Figure 3. Saturation curves of STEC strains and their derived mutants (Δ *fliC* and Δ *ompA*) in the raw milk**
 377 **cream layer obtained by natural creaming assay. The concentration of each strain in the raw milk cream layer**
 378 **as a function of the initial concentration in milk was plotted for each milk used (points) as well as the regression**
 379 **curve (flat line). Colors represent different milks (n=3). For two milks, the coefficient of the linear portion of the**
 380 **regression curve was the same value (same volume of cream). Therefore, these curves are superimposed on the**
 381 **graphs.**

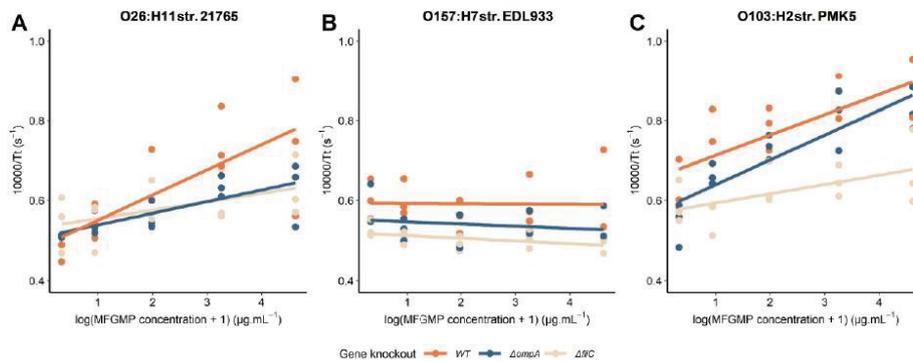


382

383 **Figure 4. Estimation of the saturation concentration (SC) of STEC strains and their derived mutants ($\Delta fliC$**
 384 **and $\Delta ompA$) in the raw cream layer from natural creaming assays.** Segments represent the 95% confidence
 385 intervals (CI). For O103:H2 str. PMK5 WT, $\Delta fliC$, and $\Delta ompA$, the model could not estimate an SC, which was
 386 considered as non-saturation in these conditions. Black bars represent the mean of the maximal spiked level
 387 ($C_{milk_{max}}$). Strains with an SC above this threshold, such as O157:H7 str. EDL933 $\Delta ompA$, were considered non-
 388 saturating under these conditions. Each knockout gene is displayed by a distinct color.

389 Impact of STEC gene deletions on capacity to adhere to MFGMPs

390 The *fliC* and *ompA* knockouts appeared to decrease the adhesion to MFGMPs of the three WT strains assayed
 391 (Figure 5). To confirm this observation, slope comparisons between mutants and WT strains were made by linear
 392 regression with interaction terms (Table 5). Estimation of the coefficient of slopes statistically confirmed the
 393 graphical observations only for the *fliC* knockouts of O26:H11 str. 21765 (p-value = 0.031) and O103:H2 str. PMK5
 394 (p-value = 0.034) (interaction term; Table 5). For O157:H7 str. EDL933 and its derived mutants, no difference in
 395 the slope coefficient was observed. Moreover, the slope coefficient of the WT strain was not statistically different
 396 from zero. Therefore, the assayed O157 strains showed little or no affinity for MFGMPs. The basal adhesion
 397 (absence of MFGMPs) of mutated strains was not significantly different to that of WT strains, except for O157:H7
 398 str. EDL933 $\Delta fliC$ (Table 5).



399

400 **Figure 5. Capacity of STEC strains and derived mutants to adhere to milk fat globule membrane proteins**
 401 **(MFGMPs).** A plate adhesion assay was performed and the number of adherent STEC cells was estimated by the
 402 growth time delay (Tt) according to a threshold of the OD₆₀₀ at 0.02. A shorter Tt meant a larger number of cells,
 403 while a longer time meant a larger amount of adherent cells. The Tt was represented by its inverse to facilitate
 404 interpretation and linear regressions were plotted to visualize the effect of protein quantity on adhesion. Each
 405 knockout gene is shown in a different color.

406

407 **Table 5. The outputs of linear regression of the STEC-MFGMP plate adhesion assays.**

	O26:H11 str. 27165	O103:H2 str. PMK5	O157:H7 str. EDL933
(Intercept)	0.488 *** [0.429, 0.548] (0.030)	0.616 *** [0.563, 0.669] (0.026)	0.584 *** [0.552, 0.616] (0.016)
log(MFGMPs+1)	0.058 *** [0.034, 0.082] (0.012)	0.065 *** [0.043, 0.086] (0.011)	0.002 [-0.011, 0.015] (0.006)
genotypefliC	0.048 [-0.036, 0.132] (0.042)	-0.074 [-0.149, 0.002] (0.037)	-0.076 ** [-0.121, -0.031] (0.022)
genotypeompA	0.019 [-0.065, 0.103] (0.042)	-0.066 [-0.141, 0.010] (0.037)	-0.043 [-0.088, 0.002] (0.022)
log(MFGMPs+1) × genotypefliC	-0.037 * [-0.071, -0.004] (0.017)	-0.033 * [-0.063, -0.003] (0.015)	-0.006 [-0.024, 0.013] (0.009)
log(MFGMPs+1) × genotypeompA	-0.028 [-0.062, 0.006] (0.017)	0.005 [-0.025, 0.036] (0.015)	-0.004 [-0.022, 0.014] (0.009)
Num. Obs.	54	54	54
R2	0.415	0.711	0.419
R2 Adj.	0.354	0.681	0.358
RMSE	0.08	0.07	0.04

408 Regressions were performed separately for each strain and the wild-type (WT) strain was used as a reference
 409 group to compare the coefficients with its derived mutants. The inverse of the time threshold (10,000/Tt in sec⁻¹)
 410 was used as a response variable. The 95% confidence intervals are indicated in square brackets and the standard
 411 errors are in parentheses.

412 *** p-value < 0.001; ** p-value < 0.01; * p-value < 0.05.

413

414

415

416 Discussion

417 Ingestion of foodborne pathogenic STEC can lead to serious human health consequences. Two major
418 problems are linked to STEC infections: it is a significant public health issue, with over one million cases
419 per year worldwide; and is detrimental to the food industry, leading to economic losses and destruction
420 of foodstuffs. Prophylactic measures installed throughout the food production chain reduce, but do not
421 eliminate, the risk of STEC infection. In raw milk, naturally beneficial or pathogenic bacteria can
422 associate with MFGs. Previous studies have demonstrated the affinity of STEC for MFGs and
423 highlighted a serotype- and strain-dependent concentration of STEC in the raw milk cream layer. Here,
424 we investigated the role and the specificity of STEC surface proteins in the mechanism of STEC-MFGM
425 association by natural creaming assay and plate adhesion assay.

426 First, we performed a competition assay between a protein extract enriched in STEC surface proteins
427 and intact STEC cells to evaluate the involvement of STEC membrane proteins in the affinity for MFGs.
428 We hypothesized that if STEC surface proteins are involved in the STEC-MFGM association through a
429 specific interaction, free STEC surface proteins would bind to an MFGMP receptor and therefore block
430 STEC adhesion.

431 We found that supplementation of raw milk with STEC surface proteins decreased STEC concentration
432 in cream in a dose-response manner for O157:H7 str. EDL933 and O26:H11 str. 21765 (**Figure 1A**).
433 The estimated median effective dose (ED_{50}) was almost twenty times higher for strain O157 than for
434 strain O26. Therefore, a greater amount of protein was required to induce an effect on O157:H7 str.
435 EDL933, suggesting different proportions of bioactive proteins in the extracts of each strain.

436 Without the addition of surface proteins, O157:H7 str. EDL933 was approximately two times more
437 concentrated in the cream layer than O26:H11 str. 21765. This may explain, in part, the greater amount
438 of protein required to observe an effect. In addition, we know that O26:H11 str. 21765 saturates more
439 rapidly than O157:H7 str. EDL933. Thus, according to our hypothesis, STEC strain 21765 would
440 recognize fewer binding sites on the surface of MFGs than EDL933, and therefore fewer proteins would
441 be needed to block its concentration in the cream layer.

442 However, this does not explain why the protein extracts of O103:H3 str. PMK5 did not show any
443 inhibitory effect (**Figure 1A and 1D**). The lack of inhibitory effect for O103:H3 str. PMK5 could be
444 explained in part by our experimental methods. First, the extraction yield can be different between
445 strains. STEC strains are known to present a large genetic diversity (Douëllou et al., 2016, 2017a). Thus,
446 depending on the type of proteins expressed by each strain, it may be more or less difficult to extract
447 the proteins that are highly anchored in the membrane. Second, protein conformation after extraction
448 may be different from native conformation, hiding epitopes involved in adhesion. Third, the affinity of
449 O103:H3 str. PMK5 may be based on a more complex and multifactorial mechanism than other strains.
450 In addition, we set the membrane protein adhesion conditions to 2 h at 4°C to be consistent between
451 experiments. While we previously showed that this time was sufficient to allow STEC adhesion to
452 MFGMPs (Bagel et al., 2022b), a longer time may override the lack of effect observed with O103:H3 str.
453 PMK5.

454 Following these observations, we wondered whether the inhibition effect mediated by STEC surface
455 proteins was strain-specific. By natural creaming crossing-competition assay, we found that the
456 inhibition was strain-specific, at least at the tested concentration ($0.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (**Figure 1B to D**). The
457 lack of complementarity with protein extracts from other STEC strains would suggest that the inhibition
458 of this pathogen in the cream layer is potentially related to a strain-specific mechanism. To the authors'
459 knowledge, no similar study, even on other bacterial species, has been published. These studies are
460 the first to be performed with STEC.

461 The inhibition associated with free STEC membrane proteins seems to be more related to a repulsion
462 effect of STEC cells from the cream layer than to an antimicrobial effect. Surface protein extracts did
463 not affect the viability of the strains after 24 h at 4°C (data not shown). In addition, if there was an
464 antimicrobial effect, the concentration of STEC should be lower at high concentrations of added proteins.
465 However, we observed saturation of the protein effect at $6 \log_{10} \text{CFU.mL}^{-1}$ (**Figure 1A**), which
466 corresponds to the initial concentration of inoculum. In this condition, the repartition of STEC in the
467 cream or the aqueous phase is homogenous.

468 Raw milk is a very complex and unstable biological liquid. The addition of external elements, such as
469 protein extracts, can disrupt the balance of ionic and electrical forces native to raw milk through the
470 adsorption of molecules of the protein extract at the MFGM. These physicochemical modifications can

471 induce aggregation of MFGs or serum proteins and block STEC access to adhesion sites. Given the
472 results obtained in the crossing experiment, where effects were only observed for one strain, we believe
473 that the addition of protein only slightly modifies the stability of milk.

474 Due to the small sample size, the power of statistical tests was quite low, although significant effects
475 were demonstrated. Data checked all conditions for a parametric test, but as a precaution, we also
476 performed a non-parametric test. Further studies with more replicates are needed to confirm the
477 specificity of surface protein extracts in the inhibition of bacterial adhesion. Furthermore, the biological
478 question could be broadened by studying whether the inhibition effect is conserved within a serotype.

479 We then focused on identifying which bioactive compounds in the protein extracts may be involved in
480 STEC inhibition in the cream layer. According to our hypothesis, STEC surface proteins could play a
481 major role in this phenomenon. Thus, a label-free proteomic study was performed to identify the STEC
482 surface proteins associated with the MFGM fraction after natural creaming.

483 The major MFGMPs, such as xanthine dehydrogenase/oxidase, butyrophilin, and lactadherin (Ortega-
484 Anaya et al., 2022) were identified in all samples. In addition, no proteins from the aqueous phase of
485 raw milk such as casein or β -lactoglobulin were identified. These data confirm that the method used for
486 MFGMP extraction was effective and therefore, the STEC proteins identified are likely to be strongly
487 associated with the MFGM protein fraction. Among the identified STEC membrane-associated proteins,
488 the Outer membrane protein A (OmpA) and the flagellin (FliC) warranted further investigation. Therefore,
489 we created mutant strains to assess the involvement of these proteins in the concentration of STEC
490 strains in cream and their ability to adhere to MFGMPs.

491 OmpA, a well-known bacterial protein involved in adhesion (Hirakawa et al., 2021), was identified in all
492 samples but was found in significantly higher levels in samples supplemented with surface proteins
493 derived from O26:H11 str. 21765. A previous study showed that protein extracts of the three strains
494 studied here had no significant difference in OmpA expression (Bagel et al., 2022b), suggesting a
495 preferential affinity of the OmpA variant of O26:H11 str. 21765. In this study, *OmpA* deletion showed a
496 significant effect compared to the WT strain only for O26:H11 str. 21765, but not for other strains.
497 However, the effect of *ompA* deletion on the behavior of strain O26 is the opposite of what we expected;
498 this mutagenic strain was able to concentrate more in the cream than WT O26:H11 str. 21765 (**Figure**

499 3 and **Figure 4**). This phenomenon is probably related to mechanisms other than adhesion to MFGMPs
500 since all three mutants for *ompA* showed similar MFGMP adhesion abilities as the WT strains (**Figure**
501 5).

502 Alignment of the OmpA protein sequence showed an E → K mutation at residue 89 in O26:H11 str.
503 21765, that was not present in other strains (**Supplementary Material Figure S1**). This mutation
504 provides partial susceptibility to phage M1 and increases resistance to colicin L (Morona et al., 1984,
505 1985). In addition, OmpA is a major target of mammalian host cell defense (Wang, 2002) and may be
506 targeted by immune cells contained in raw milk. Therefore, *ompA* deletion could improve survival of this
507 strain. Moreover, *ompA* knockout (KO) affects the shape and size of various bacteria, including the
508 EDL933 strain (Nagy et al., 2015), leading to compromised outer membrane integrity and spherical
509 morphology. Our results suggest that OmpA may be more involved in physiological interactions than in
510 adhesive interactions.

511 The flagellin (FliC) was identified only in samples supplemented with surface proteins from O26:H11 str.
512 21765 (**Supplementary Table S1**). Regardless of the sample, only one peptide
513 (FDSAITNLGNTVNNLSSAR) related to the FliC protein sequence was identified by MS/MS. This
514 peptide is present in the FliC protein sequences of O26:H11 str. 21765 and O103:H2 str. PMK5 (data
515 not shown). Interestingly, in our previous study, FliC protein was relatively more present in the protein
516 extracts of other strains than in O26:H11 str. 21765 (Bagel et al., 2022b). We also found that the STEC-
517 MFG association is not always stable and that bacteria can move around and between MFGs,
518 suggesting the involvement of bacterial mobility in the affinity of STEC for MFGs (data not shown). In
519 addition, given that flagellin has been widely described as a potential adhesin (Nedeljković et al., 2021)
520 and is intrinsically linked to serotype, we speculated that it may play a key role in the STEC-MFGM
521 association. Nevertheless, the flagellin FliC did not seem to be strongly involved in the concentration of
522 STEC in the cream (**Figure 3** and **Figure 4**).

523 Although *fliC* deletion did not decrease the concentration of STEC in cream, a decrease in the
524 attachment to MFGMPs was noted (**Figure 5**). The effect seemed to be more pronounced for O103:H2
525 str. PMK5 than the other two strains. Interestingly, in experimental culture conditions used for raw milk
526 spiking (BHI; 37°C), O26:H11 str. 21765 did not show mobility in a low agar content plate, unlike
527 O157:H7 str. EDL933 and O103:H2 str. PMK5 (data not shown). The lack of motility may reflect the low

528 *fliC* expression in O26:H11 str. 21765 and therefore, this protein may not be involved in STEC-MFG
529 association in this strain. These differences could explain the stronger inhibition of adhesion seen in
530 O103:H2 str. PMK5 Δ *fliC*, compared with O26:H11 str. 21765 Δ *fliC*. The motility of STEC in raw milk
531 and/or their attraction to MFGs did not seem to be strongly involved in STEC concentration in the raw
532 cream layer. This variation should be further studied in raw milk conditions.

533 Also, it is important to note that MFGMPs are in different physicochemical conditions and conformations
534 in the plate adhesion and natural creaming assays. In natural creaming, the proteins are anchored in
535 the MFGM and have a native conformation whereas, in plate adhesion assays, proteins have been
536 extracted from their membrane. Therefore, their hydrophobic domain, which is normally anchored in the
537 membrane, becomes available to bacteria. We do not know the conformation of these proteins under
538 these conditions. Moreover, the plate adhesion assay was designed to assess the relative quantification
539 of STEC adhesion at the population level. The resolution of the quantifying method may not be sufficient
540 to observe a slight difference. In addition, we found that the relationship between the concentration of
541 MFGMPs and the Tt was not strictly linear, especially for O103:H2 str. PMK5 (**Figure 5**). It appears that
542 the strain reached saturation of its adhesion capacity or steric interference occurred at high
543 concentrations of MFGMPs. However, the use of linear regression on these data allowed us to highlight
544 a trend of adhesion profiles towards MFGMPs.

545 In the absence of added STEC surface proteins, the STEC cells were concentrated in the cream layer,
546 consistent with our previous experiment performed with a larger volume of milk (Bagel et al., 2022a).
547 Based on saturation concentration (SC) values, all mutant strains derived from O26:H11 str. 21765,
548 except the *ompA* mutant, formed a distinct group that differed from the O157 strains, as we have
549 previously shown (Bagel et al., 2022a). Compared to the previous study, O26:H11 str. 21765 and
550 O157:H7 str. EDL933 showed higher SC values but the difference remained similar in both experiments.
551 For the assays presented here, enumeration was performed by the microdilution method, which could
552 explain the different estimated results. This could also explain why the model failed to estimate the SC
553 of PMK5 strains. However, in our previous study, PMK5 was also considered a non-saturating strain.

554 In addition to the *OmpA* and *FliC* proteins, we identified two other membrane proteins. The long-chain
555 fatty acid transport protein (*FadL*) was identified in only one of the samples enriched with proteins from
556 O26:H11 str. 21765. The outer membrane protein N (*OmpN*) was identified in samples enriched with

557 protein extracts from O157:H7 str. EDL933 and O103:H2 str. PMK5. However, the peptide used for
558 relative quantification was not specific to our strains. Raw milk is a non-sterile product and contains a
559 rich and diverse microbiota, making it difficult to discriminate between added STEC proteins and native
560 bacterial proteins in milk (O'Sullivan and Cotter, 2017). This was also the case for the outer membrane
561 protein C (OmpC), another outer membrane protein involved in bacterial adhesion (Rolhion et al., 2007;
562 Hejair et al., 2017) that was identified in all samples.

563 Additionally, a significant number of bacterial cytoplasmic proteins were also identified, suggesting a
564 potential role in the inhibition of STEC concentration in the cream layer (**Table 4**). Moreover, the real
565 number of *E. coli* proteins associated with the protein fraction of MFGM is probably much higher than
566 the number of proteins that we have identified by MS/MS, due to the complexity of the samples and the
567 high proportion of MFGMPs compared to *E. coli* proteins. The addition of a decomplexation step for
568 proteomic analysis showed an enrichment of more than 50% of bovine proteins compared with two
569 additional proteins potentially associated with *E. coli* (data not shown). The addition of a decomplexation
570 step was significantly not sufficient to expand the number of proteins associated with *E. coli*. In addition,
571 other STEC proteins may play a key role in association with MFGs, but if these proteins have low affinity
572 and interaction strength for MFGMPs, they were most likely removed during the washing step and
573 therefore could not be identified.

574 Taken together, free STEC surface proteins appear to act as competitors for bacterial cell surface-
575 anchored proteins, thereby abolishing the concentration of STEC in the cream. However, the lack of
576 effect when surface proteins from another strain are used to supplement raw milk suggests that this
577 inhibition is strain-specific. Furthermore, STEC surface proteins involved in association with MFGs also
578 appear to be strain-specific, as are the adhesion epitopes of the recognized MFGs. This is consistent
579 with previous observations that O157:H7 str. EDL933 was still able to concentrate in the cream layer
580 already saturated by O26:H11 str. 21765 (Bagel et al., 2022). The strain-specific effect makes it more
581 challenging to fully understand the mechanisms of STEC-MFG association. Concerning the candidate
582 STEC proteins, OmpA and FliC proteins did not seem to be strongly involved in STEC concentration in
583 the cream layer. However, an adhesion effect was observed between MFGMPs and *fliC* mutants.
584 Therefore, the concentration of STEC in the cream may be based on other mechanisms intrinsic to the
585 natural creaming process.

586 This study did not fully elucidate the STEC-MFG association due to the rich protein content of raw milk
587 and the difficulty of obtaining a pure fraction representative of STEC surface proteins. Better
588 characterization of the STEC protein extract as well as development of an alternative holistic method
589 could create new opportunities to understand the molecular interactions involved in STEC-MFG
590 association. Further studies are also needed to explore the genetic regulation of STEC in raw milk
591 supplemented with surface proteins. The association of bacteria, including STEC, to MFGs, is likely to
592 be a complex and multifactorial event.

593 **Acknowledgments**

594 This research grant was funded by the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière
595 (CNIEL, French Dairy Interbranch Organization, Paris). The French Ministry of Agriculture and VetAgro
596 Sup have also funded part of this work. The authors thank the staff of the French National Reference
597 Laboratory on pathogenic *E. coli* (including STEC), Dr. Grégory Jubelin for bacterial mutagenic tools,
598 and Leah Cannon for the English language editing of this manuscript.

599 The authors declare no conflict of interest.

600 **References**

- 601 Anderson, J.F. 1909. The Relative Proportion Of Bacteria In Top Milk (Cream Layer) And Bottom Milk
602 (Skim Milk), And Its Bearing On Infant Feeding. *J. Infect. Dis.* 6:392–400.
603 <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/6.3.392>.
- 604 Asadi, A., S. Razavi, M. Talebi, and M. Gholami. 2019. A review on anti-adhesion therapies of bacterial
605 diseases. *Infection* 47:13–23. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-018-1222-5>.
- 606 Bagel, A., M.-L. Delignette-muller, C. Lopez, V. Michel, D. Sergentet-Thevenot, and T. Douëllou. 2022a.
607 Strain- and serotype-dependent affinity of Shiga Toxin-Producing-Escherichia coli for bovine
608 milk fat globules. *J. Dairy Sci.* In press.

609 Bagel, A., C. Lopez, E. David-Briand, V. Michel, T. Douëllou, and D. Sergentet-Thevenot. 2022b.
610 Serotype-dependent adhesion of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to bovine milk fat
611 globule membrane proteins. *Front. Microbiol.* In soumission.

612 Bagel, A., and D. Sergentet. 2022. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Milk Fat Globules.
613 *Microorganisms* 10:496. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10030496>.

614 Baron, F., M.-F. Cochet, W. Ablain, N. Grosset, M.-N. Madec, F. Gonnet, S. Jan, and M. Gautier. 2006.
615 Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of
616 the conventional plate-counting technique. *Le Lait* 86:251–257. [http://dx.doi.org/DOI:](http://dx.doi.org/DOI:10.1051/lait:2006005)
617 [10.1051/lait:2006005](http://dx.doi.org/DOI:10.1051/lait:2006005).

618 Bird, J. 1991. Cream separation. *Int. J. Dairy Technol.* 44:61–63. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-](http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.1991.tb00638.x)
619 [0307.1991.tb00638.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.1991.tb00638.x).

620 Brisson, G., H.F. Payken, J.P. Sharpe, and R. Jiménez-Flores. 2010. Characterization of *Lactobacillus*
621 *reuteri* Interaction with Milk Fat Globule Membrane Components in Dairy Products. *J. Agric.*
622 *Food Chem.* 58:5612–5619. <http://dx.doi.org/10.1021/jf904381s>.

623 Cebo, C., H. Caillat, F. Bouvier, and P. Martin. 2010. Major proteins of the goat milk fat globule
624 membrane. *J. Dairy Sci.* 93:868–876. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2638>.

625 Datsenko, K.A., and B.L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia*
626 *coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:6640–6645.
627 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>.

628 Douëllou, T., S. Delannoy, S. Ganet, P. Fach, E. Loukiadis, M.C. Montel, and D. Sergentet-Thevenot.
629 2017a. Molecular characterization of O157:H7, O26:H11 and O103:H2 Shiga toxin-producing
630 *Escherichia coli* isolated from dairy products.. *Int. J. Food Microbiol.* 253:59–65.
631 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.010>.

632 Douëllou, T., S. Delannoy, S. Ganet, P. Mariani-Kurkdjian, P. Fach, E. Loukiadis, Mc. Montel, and D.
633 Thevenot-Sergentet. 2016. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dairy

634 products — Genetic diversity and virulence gene profiles. *Int. J. Food Microbiol.* 232:52–62.
635 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.032>.

636 Douëllou, T., W. Galia, S. Kerangart, T. Marchal, N. Milhau, R. Bastien, M. Bouvier, S. Buff, M.-C.
637 Montel, and D. Sergentet-Thevenot. 2018. Milk Fat Globules Hamper Adhesion of
638 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* to Enterocytes: In Vitro and in Vivo Evidence. *Front.*
639 *Microbiol.* 9. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00947>.

640 Douëllou, T., M.C. Montel, and D. Thevenot Sergentet. 2017b. Invited review: Anti-adhesive properties
641 of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane-associated glycoconjugates
642 against bacterial food enteropathogens. *J. Dairy Sci.* 100:3348–3359.
643 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11611>.

644 EFSA and ECDC, (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and
645 Control). 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J.* 17:e05926.
646 <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>.

647 EFSA and ECDC, (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and
648 Control). 2021a. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.* 19:e06406.
649 <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>.

650 EFSA and ECDC, (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and
651 Control). 2021b. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA J.* 19:e06971.
652 <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>.

653 Euber, J.R., and J.R. Brunner. 1984. Reexamination of Fat Globule Clustering and Creaming in Cow
654 Milk. *J. Dairy Sci.* 67:2821–2832. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81642-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81642-2).

655 FAO and WHO. 2019. Attributing illness caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) to
656 specific foods. *Microbiological Risk Assessment Series*. FAO, Rome, Italy.

657 Galia, W., P. Mariani-Kurkdjian, E. Loukiadis, S. Blanquet-Diot, F. Leriche, H. Brugère, A. Shima, E.
658 Oswald, B. Cournoyer, and D. Thevenot-Sergentet. 2015. Genome Sequence and Annotation

659 of a Human Infection Isolate of Escherichia coli O26:H11 Involved in a Raw Milk Cheese
660 Outbreak. *Genome Announc.* 3:e01568-14. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.01568-14>.

661 Gomand, F., F. Borges, D. Salim, J. Burgain, J. Guerin, and C. Gaiani. 2018. High-throughput screening
662 approach to evaluate the adhesive properties of bacteria to milk biomolecules. *Food Hydrocoll.*
663 84:537–544. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.038>.

664 Guerin, J., C. Soligot, J. Burgain, M. Huguet, G. Francius, S. El-Kirat-Chatel, F. Gomand, S. Lebeer, Y.
665 Le Roux, F. Borges, J. Scher, and C. Gaiani. 2018. Adhesive interactions between milk fat
666 globule membrane and *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit bacterial attachment to Caco-2 TC7
667 intestinal cell. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 167:44–53.
668 <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.044>.

669 Hejair, H.M.A., Y. Zhu, J. Ma, Y. Zhang, Z. Pan, W. Zhang, and H. Yao. 2017. Functional role of ompF
670 and ompC porins in pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 107:29–
671 37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.033>.

672 Hirakawa, H., K. Suzue, A. Takita, and H. Tomita. 2021. Roles of OmpA in Type III Secretion System-
673 Mediated Virulence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Pathog. Basel Switz.* 10:1496.
674 <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10111496>.

675 Horemans, T., M. Kerstens, S. Clais, K. Struijs, P. van den Abbeele, T.V. Assche, L. Maes, and P. Cos.
676 2012. Evaluation of the Anti-Adhesive Effect of Milk Fat Globule Membrane Glycoproteins on
677 *Helicobacter pylori* in the Human NCI-N87 Cell Line and C57BL/6 Mouse Model. *Helicobacter*
678 17:312–318. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-5378.2012.00948.x>.

679 Jiménez-Flores, R., and G. Brisson. 2008. The milk fat globule membrane as an ingredient: why, how,
680 when?. *Dairy Sci. Technol.* 88:5–18. <http://dx.doi.org/10.1051/dst:2007005>.

681 Kahane, I., and I. Ofek. 2012. Toward Anti-Adhesion Therapy for Microbial Diseases. *Advances in*
682 *Experimental Medicine and Biology*. Springer Nature, London, UK.

683 Lamson, R.W. 1918. A Comparison of Bacteria Counts in Whole and Skim Milk, Separator and
684 Centrifuge Cream. *J. Dairy Sci.* 1:498–507. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(18)94395-X)
685 0302(18)94395-X.

686 Leonard, A.C., L.E. Petrie, and G. Cox. 2019. Bacterial Anti-adhesives: Inhibition of *Staphylococcus*
687 aureus Nasal Colonization. *ACS Infect. Dis.* 5:1668–1681.
688 <http://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00193>.

689 Lopez, C., and O. Ménard. 2011. Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural
690 investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation
691 of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 83:29–41.
692 <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.039>.

693 Mariani-Kurkdjian, P., E. Denamur, A. Milon, B. Picard, H. Cave, N. Lambert-Zechovsky, C. Loirat, P.
694 Goulet, P.J. Sansonetti, and J. Elion. 1993. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2
695 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J. Clin. Microbiol.* 31:296–301.
696 <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.31.2.296-301.1993>.

697 Morona, R., M. Klose, and U. Henning. 1984. *Escherichia coli* K-12 outer membrane protein (OmpA) as
698 a bacteriophage receptor: analysis of mutant genes expressing altered proteins. *J. Bacteriol.*
699 159:570–578. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.159.2.570-578.1984>.

700 Morona, R., C. Krämer, and U. Henning. 1985. Bacteriophage receptor area of outer membrane protein
701 OmpA of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 164:539–543.
702 <http://dx.doi.org/10.1128/jb.164.2.539-543.1985>.

703 Mulder, H., and P. Walstra. 1974. *The Milk Fat Globule*. Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham
704 Royal, England.

705 Nagy, A., J. Mowery, G.R. Bauchan, L. Wang, L. Nichols-Russell, and X. Nou. 2015. Role of Extracellular
706 Structures of *Escherichia coli* O157:H7 in Initial Attachment to Biotic and Abiotic Surfaces. *Appl.*
707 *Environ. Microbiol.* 81:4720–4727. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00215-15>.

708 Nedeljković, M., D.E. Sastre, and E.J. Sundberg. 2021. Bacterial Flagellar Filament: A Supramolecular
709 Multifunctional Nanostructure. *Int. J. Mol. Sci.* 22:7521. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22147521>.

710 Ofek, I., E.A. Bayer, and S.N. Abraham. 2013. Bacterial Adhesion. E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory,
711 E. Stackebrandt, and F. Thompson, ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

712 Ofek, I., D.L. Hasty, and N. Sharon. 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and
713 problems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38:181–191. [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00228-1)
714 [8244\(03\)00228-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00228-1).

715 Ortega-Anaya, J., A. Marciniak, and R. Jiménez-Flores. 2022. Milk Lipids: Milk Fat Globule Membrane.
716 P.L.H. McSweeney and J.P. McNamara, ed. Academic Press, Oxford.

717 Orth, K., and A.-M. Krachler. 2013. Made to Stick: Anti-Adhesion Therapy for Bacterial Infections: A
718 major advantage in targeting adhesion is that the body clears invading pathogens instead of
719 killing them. *Microbe Mag.* 8:286–290. <http://dx.doi.org/10.1128/microbe.8.286.1>.

720 O'Sullivan, O., and P.D. Cotter. 2017. Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheeses. Academic Press.
721 P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, P.D. Cotter, and D.W. Everett, ed. Academic Press, San Diego.

722 Patton, S., and G.E. Huston. 1986. A method for isolation of milk fat globules. *Lipids* 21:170–174.
723 <http://dx.doi.org/10.1007/BF02534441>.

724 Perna, N.T., G. Plunkett, V. Burland, B. Mau, J.D. Glasner, D.J. Rose, G.F. Mayhew, P.S. Evans, J.
725 Gregor, H.A. Kirkpatrick, G. Pósfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E.J.
726 Grotbeck, N.W. Davis, A. Lim, E.T. Dimalanta, K.D. Potamouisis, J. Apodaca, T.S.
727 Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D.C. Schwartz, R.A. Welch, and F.R. Blattner. 2001. Genome
728 sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529.
729 <http://dx.doi.org/10.1038/35054089>.

730 Pizarro-Cerdá, J., and P. Cossart. 2006. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell* 124:715–
731 727. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012>.

732 Ritz, C., F. Baty, J.C. Streibig, and D. Gerhard. 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*
733 10:e0146021. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>.

- 734 Rolhion, N., F.A. Carvalho, and A. Darfeuille-Michaud. 2007. OmpC and the σ E regulatory pathway are
735 involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain
736 LF82. *Mol. Microbiol.* 63:1684–1700. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05638.x>.
- 737 Ross, S.A., J.A. Lane, M. Kilcoyne, L. Joshi, and R.M. Hickey. 2016. Defatted bovine milk fat globule
738 membrane inhibits association of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with human
739 HT-29 cells. *Int. Dairy J.* 59:36–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.03.001>.
- 740 Sharon, N. 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim.*
741 *Biophys. Acta* 1760:527–537. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.12.008>.
- 742 Wang, Y. 2002. The Function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:396–
743 401. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2002.6657>.
- 744 WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology
745 reference group 2007-2015. 2015. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 746
- 747

Partie 3

Discussion & Perspectives

Chapitre 7. Les résultats expérimentaux.....	173
Chapitre 8. Perspectives expérimentales.....	181
Chapitre 9. Prévention et traitements thérapeutiques des infections à STEC.....	187

Chapitre 7

Les résultats expérimentaux

Les *Escherichia coli* producteurs de shiga toxines (STEC) sont des bactéries zoonotiques d'origine alimentaire associées à des épidémies de grande envergure et représentent un problème de santé publique de premier ordre. Près de la moitié des cas d'infections à STEC sont dues à l'ingestion d'aliments contaminés tels que les produits laitiers fabriqués à base de lait cru, de la viande ou encore des végétaux consommés crus ou insuffisamment cuits. Ces infections sont à l'origine de complications sévères comme des syndromes hémolytiques et urémiques (SHU), en particulier chez les enfants. Ainsi, l'avenir des produits au lait cru pourrait être menacé, alors même que de nombreux chercheurs louent leurs bienfaits pour la santé humaine. L'une des priorités des services de santé publique et des professionnels de la filière est de prévenir ces cas d'infections graves qui mettent en péril les filières agroalimentaires.

Des travaux précédemment menés au laboratoire ont montré que les globules gras du lait cru bovin sont capables d'inhiber l'adhésion des STEC pathogènes aux entérocytes. Lors du processus infectieux, l'adhésion des STEC aux entérocytes est nécessaire afin qu'ils ne

soient pas éliminés par les mécanismes naturels de défense de l'hôte. Les deux principaux objectifs de cette thèse ont été (i) d'évaluer l'association de souches STEC avec les globules gras du lait cru et la réduction du niveau des STEC dans le lait cru via l'élimination de la matière grasse et (ii) d'identifier la nature de l'association STEC-MFGs et les composants moléculaires des STEC impliqués dans l'association. Ce projet a fourni des données essentielles aux scientifiques ainsi qu'aux gestionnaires du risque sur la capacité des STEC pathogènes issus de produits laitiers à se lier aux globules gras du lait cru.

A. L'affinité des STEC pour les globules gras

Dans une première partie de nos travaux, nous avons approfondi un travail préliminaire qui avait mis en évidence un tropisme différent de deux souches STEC pour la crème du lait cru (Douëllou et al., 2018). Ces observations avaient été réalisées en modèle crémage qui repose sur un phénomène naturel de concentration des globules gras en surface, formant ainsi une couche de crème. Les conclusions de cette étude présupposaient que les différences d'affinité observées entre les souches pourraient être corrélées au sérotype des souches STEC et à leur bagage génétique.

Le crémage naturel était autrefois couramment utilisé pour éliminer ou concentrer la matière grasse du lait cru avant l'invention des séparateurs de crème et permettait également d'enlever un pourcentage élevé de micro-organismes qui étaient présents (Dellaglio et al., 1969). Anderson rapportait déjà en 1909 que la quantité de bactéries retrouvées dans la crème, séparée par une écrémeuse, est plus faible que la crème issue d'un crémage naturel (Anderson, 1909). Cependant, les mécanismes liés à l'affinité de ces bactéries pour cette phase du lait cru, essentiellement composée de globules gras, n'étaient pas entièrement compris (Euber and Brunner, 1984).

D'un point de vue nutritif, la matière grasse animale est généralement assez mal perçue. De par l'essor du secteur laitier pour la nutrition infantile et la volonté d'industrialiser des produits au plus proche de la composition du lait maternel, les globules gras du lait ont été inspectés à la loupe. Il en ressort que les globules gras du lait cru présentent une originalité par rapport aux autres formes de gras animal. Outre leurs acides gras, ils contiennent une diversité de glycoconjugués ancrés dans leur membrane (MFGM) et impliqués dans diverses fonctions biologiques positives pour l'homme dont l'inhibition de l'adhésion de certains agents pathogènes. Néanmoins, peu de données sont disponibles sur les STEC.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons cherché à démontrer que l'affinité des STEC pour les globules gras était liée au sérotype de la souche. En utilisant le modèle crémage, nous avons caractérisé l'affinité d'une collection de 15 souches de *E. coli* appartenant à trois sérotypes différents. Les résultats de nos travaux suggèrent que l'affinité des STEC pour la crème, enrichie en globules gras, pourrait être générale au pathotype des STEC. De plus, la collection de souches incluait des souches AEEC (*stx*-, *eae*+) ainsi que la souche *E. coli* K-12 MG1655 qui se comportaient de manière similaire aux souches STEC, supposant que la spécificité pourrait être étendue au-delà du pathotype, jusqu'à l'espèce (**Chapitre 4**).

Comme observé dans l'étude préliminaire, les travaux présentés en **Chapitre 4** ont montré qu'un crémage permettait de concentrer entre 5 à 10 fois les STEC présents dans le lait cru. De plus, à forte concentration en STEC dans le lait cru – entre 7 et 8 log₁₀ UFC/mL – la couche de crème devenait saturée. Dans l'ensemble, les tests de saturation en modèle crémage ont montré que le tropisme des *E. coli* pour la phase grasse dépendait du sérotype et de la souche. Nous avons remarqué que les souches STEC appartenant au sérotype O157:H7 présentaient une concentration de saturation de près d'un log₁₀ de plus que la concentration de saturation des souche STEC O26:H11. Le protéome de surface bactérien pourrait jouer un rôle dans cette affinité et expliquer, en partie, les différences de concentration nécessaires pour saturer la phase grasse.

Les tendances d'affinité des STEC pour les globules gras ont également été confirmées, après publication de ces travaux, avec d'autres méthodes expérimentales par des collaborateurs impliqués dans le projet Adhé-coli (en publication). Bien que la majorité des STEC se localisait dans la crème, un nombre important de cellules était toujours présent dans la phase aqueuse. A noter qu'après un crémage naturel, la phase aqueuse n'est pas totalement exempte de globules gras. D'ailleurs, il a été observé que les cellules STEC non-présentes dans la couche de crème après crémage étaient fréquemment associées aux globules gras restés dans la phase aqueuse (données collaborateur Adhé-coli ; en publication). Nous pouvons supposer que les concentrations de saturation sont probablement plus hautes que celles que nous avons estimé. Sur la base de ces résultats, nous avons conclu que le crémage permet de réduire la quantité de STEC dans le lait mais, ne peut pas, à lui seul, éliminer le danger STEC dans le lait cru.

Le crémage a été utilisé comme modèle dans cette étude, car nécessitant l'emploi de peu de matériel, il est adapté aux bactéries pathogènes manipulées dans un laboratoire de niveau de sécurité 3 (NSB3). Nous soulignons cependant que cette méthode est assez éloignée des pratiques utilisées par les industriels de nos jours, mais permet une étude simple

de l'association STEC-globules gras dans les conditions que nous avons choisies. Toutefois, nous avons mis en œuvre une étude comparative destinée à évaluer la corrélation entre la concentration des bactéries dans la crème après un crémage naturel et un écrémage qui se rapproche plus des pratiques industrielles. Dans nos conditions expérimentales, les résultats de cette étude indiquent que la séparation des globules gras du lait cru par une écrémeuse ne permet pas d'observer le phénomène de concentration tel que nous l'avons décrit par crémage (non publié).

Les deux méthodes de séparation des globules gras du lait cru reposent sur des mécanismes différents et ne présentent pas les mêmes conditions physico-chimiques (température et force exercée). De plus, lors du crémage, les petits globules gras ($< 1 \mu\text{m}$) sont entraînés par les gros et remontent en surface. Ainsi, une crème obtenue par crémage se compose davantage de petits globules gras et, par conséquent la surface totale de la MFGM est plus importante dans ce type de crème que dans une crème obtenue par écrémage. Il en résulte donc, théoriquement, un taux de saturation par les bactéries plus important. Egalement, des travaux ont montré que la composition de la MFGM variait en fonction de la taille des globules gras (Lu et al., 2016). La spécificité de l'adhésion des STEC aux globules gras pourrait alors être dépendante de leur taille.

B. Mécanismes de l'association STEC-Globules gras

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires utilisés par les STEC pour s'associer avec les globules gras. De par l'origine biologique de la MFGM et les données de la littérature, nous avons supposé que la localisation des STEC dans la crème pouvait se faire par l'intermédiaire d'interactions entre les protéines de la membrane des globules gras (MFGMPs) et les protéines de surface des STEC.

L'adhésion des bactéries aux composants de surface de la MFGM a été démontrée pour diverses espèces bactériennes, en particulier pour les bactéries lactiques et propioniques (Brisson et al., 2010; Douëllou et al., 2017b; Gomand et al., 2018; Guerin et al., 2018). Ces bactéries, souvent considérées comme probiotiques, car elles ont des effets bénéfiques pour la santé gastro-intestinale, renforcent le système immunitaire et inhibent l'adhésion des bactéries pathogènes aux entérocytes. L'alimentation étant une source majeure de bactéries, la compréhension de leurs interactions avec les composants alimentaires et des mécanismes de livraison dans l'intestin est une pierre angulaire à la réalisation de leurs propriétés bénéfiques.

L'association bactérie-globules gras a particulièrement été étudiée sous l'angle « globules gras », en mettant en évidence les protéines de la MFGM reconnues par les bactéries, comme la mucine, la butyrophiline, la lactadhérine et des oligosaccharides sialylés (Schroten et al., 1992; Martín-Sosa et al., 2002; Kvistgaard et al., 2004). Cependant, très peu de travaux ont étudié les mécanismes d'association du côté de la bactérie. Seule une étude a mis en évidence l'implication des pili SpaCBA de la souche *Lactobacillus rhamnosus* GG dans l'association avec les globules gras (Guerin et al., 2018).

Nous avons émis l'hypothèse que l'association STEC-globules gras était majoritairement gouvernée par des interactions de nature ligand/récepteur. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons entrepris la stratégie suivante : évaluer les forces aspécifiques pour évaluer si un rapprochement des STEC vers les globules gras était possible (1), déterminer si les STEC pouvaient s'associer aux protéines de la MFGM (2) et évaluer le rôle des protéines de surface des STEC dans cette association (3).

Dans un premier temps, les propriétés hydrophobes/hydrophiles et la charge de surface des souches *E. coli* de la collection ont été étudiées dans les conditions physico-chimiques du lait cru. Nos travaux ont mis en évidence que ces interactions aspécifiques semblent faiblement impliquées dans des forces contraires, permettant ainsi un contact étroit entre les STEC et les globules gras et la possibilité d'établir des interactions spécifiques (**Chapitre 5**).

Deuxièmement, grâce à un test d'adhésion, nous avons démontré que les STEC présentaient la capacité à adhérer aux protéines de la MFGM et que ce phénomène était clairement lié au sérotype de la souche. Ainsi, les souches STEC O26:H11 et O103:H2 présentaient dans l'ensemble une adhésion pour les MFGMPs alors que les souches STEC appartenant au sérotype O157:H7 n'étaient que faiblement adhérentes (**Chapitre 5**). L'adhésion des STEC aux MFGMPs étant sérotype dépendant, nous avons supposé que la nature des protéines de surface exprimées par ces souches pouvait expliquer les différences d'adhésion.

Enfin, nous avons donc étudié l'implication des protéines de surface des STEC dans leur association avec les globules gras du lait cru en modèle crémage (**Chapitre 6**). Les résultats de notre étude ont suggéré une affinité des protéines de surface des STEC pour les globules gras du lait cru. Par ailleurs, nos résultats ont souligné une spécificité d'association STEC-globules gras qui semble propre à chaque souche. Cette spécificité pourrait être expliquée en partie par le type de protéines extraites de la membrane des STEC. Afin d'identifier de potentielles adhésines, nous avons identifié les protéines FliC et OmpA associées à la fraction protéique des globules gras, par spectrométrie de masse. Nous avons par la suite évalué leur

implication dans l'association STEC-globules gras par modèle crémage et par des tests d'adhésion. L'examen des protéines FliC et OmpA dans l'association des STEC avec les globules gras n'a pas révélé de défaut d'affinité pour la crème de lait cru après crémage. Par contre, nous avons observé que l'absence de FliC modulait l'adhésion des souches avec les protéines de la MFGM. La flagelline a été décrite comme une adhésine potentielle (Nedeljković et al., 2021).

Pour la première fois, nos travaux ont montré que la flagelline pourrait être impliquée dans l'association STEC-MFGMPs. Des expérimentations complémentaires sont toutefois nécessaires pour confirmer ces résultats. De plus, l'absence d'effet en crémage laisserait supposer que l'implication du flagelle dans ce phénomène est minime ou que le modèle crémage n'est pas assez spécifique pour l'étude de l'association bactéries-globules gras. D'autres mécanismes, qu'une association spécifique entre les STEC et les globules gras, pourraient également être impliqués. A titre d'exemple, les souches STEC O157:H7 ne présentaient quasi pas d'adhésion aux MFGMPs, dans les conditions expérimentales que nous avons testées, alors qu'elles présentaient une plus grande affinité pour la crème par rapport à l'ensemble des souches *E. coli* de la collection. La **Figure 21** illustre les mécanismes d'interaction possibles entre les STEC et les globules gras, en soulignant le caractère souche dépendant.

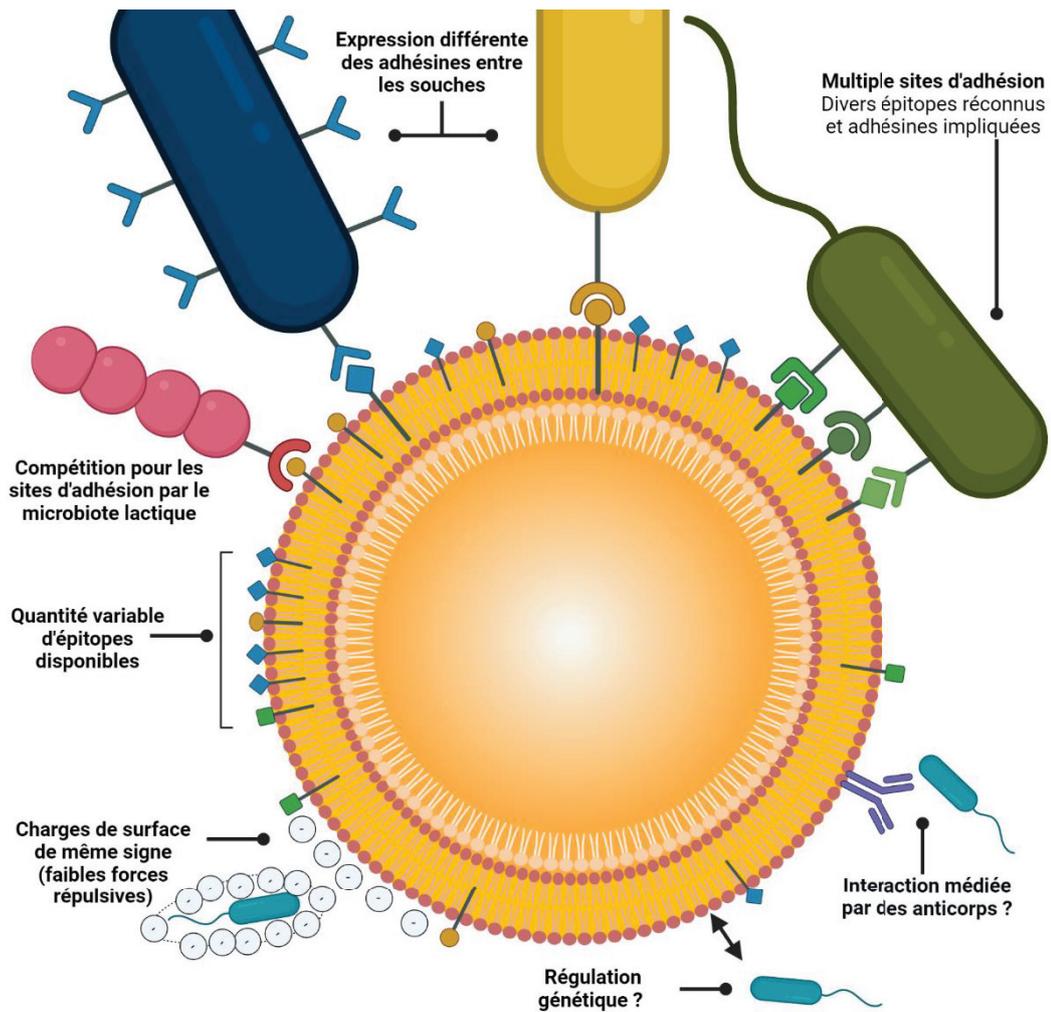


Figure 21. Propositions des mécanismes possibles d'association STEC-globules gras. Les forces aspécifiques qui s'exercent, dans les conditions physico-chimiques du lait cru, entre les STEC et les globules gras paraissent négligeables, permettant ainsi la formation de liaisons spécifiques. En effet, les globules gras et les STEC sont tous deux dispersés dans la phase aqueuse du lait grâce aux composés polaires ancrés dans leur membrane biologique. Dans les conditions physico-chimiques du lait, les charges de surface des STEC et des globules gras sont négatives et globalement de même ordre de grandeur. Les forces répulsives ainsi exercées entre la membrane des STEC et la MFGM sont faibles ; un rapprochement est alors possible. Concernant les interactions spécifiques, il semblerait que les épitopes reconnus soient de nature différente et probablement répartis de manière hétérogène à la surface de la membrane des globules gras. Aussi, le type et l'expression des structures adhésives des STEC étant différents entre les souches, la probabilité d'association est par conséquent variable. Appuyé par les données de la littérature, il est concevable que les STEC et d'autres espèces bactériennes du microbiote laitier rentrent en compétition pour les mêmes sites d'adhésion. Les STEC, et plus généralement les bactéries, pourraient aussi s'associer indirectement avec les globules gras via l'intermédiaire d'immunoglobulines. Les macromolécules associées aux globules gras jouent probablement un rôle dans la régulation génétique des STEC et dans leurs capacités d'adhésion.

Chapitre 8

Perspectives expérimentales

L'ensemble des travaux menés au cours de ma thèse confirme l'affinité des STEC pour les globules gras du lait cru et démontre une spécificité des mécanismes d'adhésion propre aux souches. Ces travaux s'insèrent comme preuves préliminaires dans l'étude des mécanismes impliqués dans l'association STEC-globules gras et plus généralement bactérie-globules gras. À l'issue de ce travail, nous avons identifié plusieurs axes de perspectives que nous présentons dans ce chapitre.

A. Confirmer la nature de l'association STEC-globules gras

Au cours de notre processus expérimental, nous avons localisé et observé les STEC à proximité des globules gras dans lait le cru. Nous avons montré que les STEC peuvent adhérer aux MFGMPs purifiés mais aucune expérience quantitative n'a réellement été réalisée dans leur conformation native, lorsqu'elles sont ancrées dans la membrane du globule gras. De plus, les résultats de nos travaux n'apportent aucune indication sur la force de l'adhésion entre les STEC et globules gras. Pour ce faire, des expérimentations par microscopie à force atomique (AFM) ou à force photonique (PhFM) pourraient être menées. La manipulation des STEC nécessitant l'accès à des équipements dans des laboratoires de sécurité de niveau 3, ce type de travaux n'était pas réalisable dans le temps imparti.

B. Vers un modèle plus simple que le crémage

Bien que le modèle crémage ait pour avantage l'environnement réel d'une contamination du lait par des souches STEC lors de la traite, ce modèle repose sur des mécanismes complexes, sensibles et pas totalement élucidés. La littérature pointe du doigt l'implication de divers mécanismes de liaison des bactéries aux globules gras. L'affinité des bactéries pour la couche de crème du lait cru après crémage serait impossible sans la présence de cellules somatiques et d'immunoglobulines (Geer and Barbano, 2014). Aussi, la température augmente significativement le taux de concentration des globules gras à la surface (Ma and Barbano, 2000).

Pour approfondir les interactions spécifiques mises en jeu entre les STEC et les globules gras, des modèles plus simples, autre que le crémage, pourraient être choisis. Les intérêts de cette recherche se portent exclusivement sur les constituants de la MFGM et non sur son cœur lipidique (TAG). Il serait alors acceptable de réduire le modèle d'étude à la MFGM uniquement. Travailler exclusivement sur la MFGM aurait pour avantage de travailler sur un échantillon structurellement moins complexe, de développer de nouveaux tests sans utiliser de détergents à forte concentration. De plus, ce modèle serait plus proche et plus en lien avec les recherches menées par les industriels et les académiciens dans le secteur de la nutrition infantile. La supplémentation des formules infantiles par des composés de la MFGM est au cœur de la recherche actuelle, le but étant de se rapprocher le plus possible de la composition du lait humain et de ses effets. La supplémentation des préparations pour nourrissons avec des fragments de la MFGM a montré des résultats positifs dans plusieurs études cliniques (Silva et al., 2021).

Travailler sur ce type de modèle nécessite d'utiliser des méthodes d'isolement et de purification qui ne dénaturent pas la MFGM afin d'être au plus proche de sa composition native. Les principales étapes de purification de la MFGM sont : la précipitation des protéines du lait (caséines et protéines du lactosérum), suivie d'une centrifugation pour récupérer la phase aqueuse, la filtration membranaire (microfiltration ou ultrafiltration) et enfin une diafiltration qui élimine le lactose et les minéraux (Lopez et al., 2018). Plusieurs protocoles pour ce type d'extraction ont été proposés (Fuller et al., 2013; Zanabria et al., 2020).

C. Identifier les composants moléculaires impliqués dans l'association STEC-globules gras

Pour identifier les molécules impliquées dans l'interaction STEC-globules gras, notre ligne conductrice a été l'utilisation d'approches holistiques, sans a priori sur les protéines engagées. Au cours de ce projet, plusieurs pistes méthodologiques ont été développées en parallèle et seulement une a été concluante dans le temps imparti.

C.1. Les composants des STEC

C.1.1. Approche 1 : Criblage par spectrométrie de masse des protéines associées à la MFGM

Nos travaux pourraient se poursuivre en caractérisant davantage les extraits protéiques des membranes/parois des STEC. Nous avons démontré dans le **Chapitre 6** que les extraits protéiques des STEC avaient un effet inhibiteur dans l'association STEC-globules gras. Cependant, il est impossible de déterminer la ou les protéines responsables de cet effet car près de 1 000 protéines ont été identifiées dans chaque extrait. Il pourrait être alors intéressant de décomplexifier les extraits protéiques, par exemple, selon la taille des protéines, et de réaliser de nouveaux tests d'adhésion sur chacune des fractions. De cette manière, une meilleure sensibilité serait obtenue et l'effet biologique serait accordé à moins de protéines (environ 200 – 300, selon la fraction et les seuils de coupures utilisées). Toutefois, ce type d'approche, combinée à l'identification des protéines STEC associées à la MFGM par spectres MS/MS, ne permettra pas de s'affranchir de la complexité des échantillons protéiques de la MFGM ; les protéines de la MFGM étant majoritaires par rapport aux protéines des STEC.

Aussi, au vu des résultats obtenus sur la souche O103:H2 str. PMK5, pour laquelle aucun effet n'a été observé, nous pourrions aussi envisager un nouveau protocole d'extraction des protéines de surface des STEC. Nous supposons que l'absence d'effet pour cette souche pourrait être expliquée par le manque du ou des composés actifs, restés attachés à la membrane de la bactérie. Les protéines membranaires présentent au moins un domaine transmembranaire hydrophobe, leur purification requiert l'utilisation de détergents (Carpenter et al., 2008).

C.1.1. Approche 2 : Identification des gènes impliqués dans l'affinité des STEC pour les globules par *transposon-insertion sequencing (TIS)*

En parallèle à l'approche décrite précédemment, une approche de type Tn-Seq avait été initialement envisagée pour cribler les gènes impliqués dans le processus de crémage et d'association aux globules gras. Cette méthode combine la mutagenèse par transposons à grande échelle et le séquençage de nouvelle génération (NGS) en masse pour estimer simultanément l'essentialité et/ou la contribution d'une caractéristique génétique dans une condition donnée (Cain et al., 2020). Cependant, nous avons fait face à un problème méthodologie lors de la création de la banque de mutants. Les résultats du séquençage des bibliothèques génomiques de la banque de mutants ont montré un fort taux d'insertion du plasmide dans le génome de la souche STEC choisie. Le plasmide-outil, utilisé pour apporter le transposon, s'est inséré de manière préférentielle, par rapport au transposon, dans le génome de la souche, probablement par recombinaison homologue. Les outils de biologie moléculaires modernes ont principalement été développés et construits chez *E. coli* ce qui peut expliquer ce biais. Le temps nécessaire pour mettre au point de nouveaux outils était limité. Nous avons choisi de mettre cette approche de côté pour le moment.

De plus, nous avons identifié plusieurs points nous limitant à utiliser une approche de type Tn-seq pour répondre à nos questions. Premièrement, nous sommes demandés si une seule mutation dans le génome bactérien pouvait induire un effet significatif sur le tropisme des STEC pour les globules gras. À ce stade du projet, nous n'avons pas encore réalisé les mutants. Deuxièmement, le lait cru étant une matrice complexe, grasse et riche en microorganismes, une étape sélective était indispensable à l'issue du criblage pour sélectionner uniquement les mutants. Cette étape était également nécessaire afin d'éliminer la matière grasse du lait cru, décrite pour perturber certaines applications moléculaires comme l'extraction d'ADN, le piégeage des bactéries ou encore comme inhibiteur de PCR (Stinson et al., 2021). Troisièmement, cette étape aurait consisté à déposer les crèmes et les bactéries

non-adhérentes contenues dans la phase aqueuse sur des géloses nutritives en présence d'agents sélectifs contre les mutants. Ainsi, seule une approche quantitative (absence/présence des mutants) aurait pu être réalisée. Notons que la mutation engendrée par le transposon doit avoir un effet stringent sur l'association aux globules gras pour qu'un effet soit clairement démontré. De nombreuses répétitions étaient donc nécessaires pour avoir une forte puissance statistique dans ces conditions.

C.1.1. Approche 3 : Une approche bio-informatique pour mettre en avant des gènes potentiellement impliqués dans l'association STEC-globules gras

Une étude d'association pangénomique (*genome-wide association studies - GWAS*) pourrait aussi être utilisée en première intention pour mettre en évidence des gènes spécifiques aux souches en fonction de leur profil d'affinité pour la crème. Ce type d'approche requiert deux conditions de base, à savoir une mesure génotypique et une mesure phénotypique, et cherche à identifier les associations entre ces variables (Chen and Shapiro, 2015). Ce type d'étude nécessite un échantillon de grande taille pour obtenir des résultats statistiquement solides. Ainsi, pour mener à bien ce type d'approche, la caractérisation d'une collection de souches STEC plus importante pour leur affinité envers les globules gras (estimation de la concentration de saturation par crémage, capacité d'adhésion aux MFGMPs) est indispensable. La mise œuvre de ce type d'expérience nécessite le développement d'une approche de mesure phénotypique plus rapide et plus efficace, qui peut être rendu possible par l'automatisation.

C.2. Composants des globules gras

Nous n'en avons pas encore discuté, mais au cours de ce projet un temps important a également été consacré à l'identification des MFGMPs reconnues par les souches STEC. Une approche de type dot-blot overlay (1D et 2D) a été développée pour identifier les protéines des globules gras reconnues par les STEC. Nous n'avons pas réussi à identifier les conditions optimales de la réalisation de ces dots-blots. Les résultats étaient peu répétitifs et les différents systèmes de révélation n'étaient pas toujours spécifiques aux STEC. Face aux difficultés méthodologiques rencontrées, nous avons décidé de mettre de côté ce projet. Toutefois, par une autre méthodologie, une action a été menée par l'une des collaboratrices du projet et a mis en évidence un défaut de localisation des STEC pour la crème lorsque les globules gras étaient dépourvus de glycoconjugués (en publication). Ces données suggèrent l'implication des glycoconjugués des MFGM dans l'affinité des STEC aux globules gras.

Lors de ces travaux, nous nous sommes principalement focalisés sur les protéines et glycoprotéines de la MFGM, mais les glycolipides et phospholipides ont aussi été décrits comme des récepteurs possibles pour les bactéries (Sánchez-Juanes et al., 2009; Zhang et al., 2020; Kosmerl et al., 2021). Aussi, la composition du lait et de la MFGM variant selon les espèces, il pourrait être intéressant d'inclure dans ces études plus de diversité, d'autant que les globules gras de caprin, de bovin et humain semblent avoir des effets bioactifs contre l'adhésion d'agents pathogènes (Yao et al., 2021).

C.3. Autres propriétés bactériennes et de surface

L'adhésion bactérienne ne se résume pas uniquement aux interactions moléculaires, d'autres propriétés propres à la bactérie sont fortement liées aux capacités d'adhésion. Nous avons montré que les propriétés hydrophiles et hydrophobes, les charges de surface des STEC et le fait de posséder un flagelle ne semblent pas expliquer les différences d'adhésion observées chez les STEC dans les conditions testées. Nous avons également évalué les capacités d'autoaggrégation des souches de collection et nous avons conclu que ces interactions ne semblent pas non plus impliquées (non montré). D'autres paramètres comme la morphologie des cellules et des membranes, le quorum-sensing, la chemotaxie, les molécules de signalisation, la réponse au stress et la formation de matrice extracellulaire polymérique ont été décrits et doivent encore être étudiés (Klančnik et al., 2020). D'autres composants de la surface bactérienne non-protéiques ou lipidiques comme les EPS pourraient donc être impliqués dans les capacités d'adhésion bactérienne aux MFGM.

Chapitre 9

Prévention et traitements thérapeutiques des infections à STEC

Face au manque de traitements efficaces contre les infections à STEC, le corps médical reste démuné. Bien que l'utilisation d'antibiotiques comme l'azithromycine ne soit pas contre-indiquée, sa prescription reste limitée et controversée. Par ailleurs, des mécanismes de résistance à cette molécule commencent à émerger pour le pathotype STEC (Bizot et al., 2022), soutenant l'urgence de l'accès à des traitements efficaces.

Les défis thérapeutiques reposent donc sur l'élaboration de stratégies qui n'augmentent pas l'expression des shiga toxines (Stx) et qui ne perturbent pas la perméabilité de la membrane bactérienne qui, dans le cas contraire, pourrait entraîner la fuite des toxines dans le tube digestif. Plusieurs alternatives aux antibiotiques ont été décrites dans la littérature, comme le blocage d'apport nutritif ou de l'expression de gènes par le biais de petits ARN interférents (ARNsi), l'utilisation de vaccins, l'utilisation de phages ou encore l'utilisation de

molécules anti-adhésives (Mousavifar and Roy, 2019). Les stratégies anti-adhésives représentent une solution intéressante puisqu'elles n'impactent pas l'intégrité de la cellule bactérienne.

A. Les fromages au lait cru comme aliment préventif de l'adhésion des STEC à la barrière intestinale

Ces travaux de thèse font suite à un travail précédent démontrant que la présence des globules gras du lait cru reculait de 6 cm l'adhésion des STEC à l'épithélium intestinal de souris, ce qui est important pour ce modèle, et modulait l'adhésion des STEC sur une co-culture de cellules HT29-MTX (Douëllou et al., 2018). Les globules gras agiraient ainsi comme des leurres pour prévenir l'adhésion de ces bactéries pathogènes à la barrière intestinale. Il est difficile de dire à ce niveau de connaissances qui des récepteurs intestinaux ou des STEC sont bloqués par les globules gras. Par ailleurs, le premier site d'adhésion des bactéries entéropathogènes au niveau de la muqueuse intestinale se situe dans le mucus (Wang et al., 2021). Une étude *in vivo* pourrait être menée pour identifier le comportement et la localisation des STEC en présence de globules gras, durant les premières heures de l'infection.

Néanmoins, les preuves scientifiques disponibles convergent vers l'idée que les globules gras, et plus particulièrement leur membrane, présentent des capacités d'inhibition de l'adhésion des STEC à la barrière intestinale. Une consommation régulière de globules gras, purs ou non contaminés, pourrait prévenir les infections à STEC et probablement à d'autres entéropathogènes. D'après les données disponibles sur les habitudes de consommation des produits au lait cru, les fromages semblent être la source la plus fréquente de globules gras et de MFGM chez l'homme (CNIEL, 2021).

Cependant, il semble assez paradoxal d'associer la consommation de produits au lait cru à un aliment préventif puisqu'ils véhiculent eux-mêmes les STEC. L'utilisation plus systématique du crémage du lait cru et du traitement de la crème avant transformation pourrait aussi être une piste pour diminuer la présence de souches STEC dans ces produits. Comme nous l'avons montré dans le premier chapitre, le crémage permet de concentrer les STEC dans la phase grasse. Le taux de contamination du lait cru est généralement estimé autour de 1 à 10 cellules par millilitres de lait. Il est difficile de donner une valeur générale de ce pathotype dans le lait car le dénombrement est soumis à de nombreux challenges analytiques (hétérogénéité, enrichissement efficace, identification des STEC parmi les autres *E. coli*, etc.). Après crémage, le risque de présence de STEC serait diminué de 5 à 10 fois. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires en modèle crémage à grande échelle. Dans tous

les cas, un traitement thermique devrait être appliqué à la matière grasse pour éliminer les STEC avant d'être réassociée à la phase écrémée du lait cru. Une grande majorité des microorganismes (STEC et le microbiote laitier) ayant été éliminée via la matière grasse, l'ajout d'une flore contrôlée paraît indispensable avant transformation. La réglementation de ce type de fabrication pourrait se rapprocher de celles qui encadrent les produits microfiltrés.

Consommer des produits au lait cru pourrait donc être vu comme un geste préventif tout en profitant de leurs propriétés gustatives. Toutefois, il est difficile d'affirmer que la consommation de produits au lait cru préviendrait totalement des infections à STEC. En parallèle, des travaux pourraient être menés pour évaluer les propriétés anti-adhésives (et plus largement anti-infectieuses) des technologies fromagères moins à risque, comme les fromages au lait cru à pâte pressée cuite (Gruyère, Emmental, Beaufort ou encore le Comté).

Toutefois, pour prévenir l'infection, l'adhésion STEC-globules gras du lait cru doit donc être possible dans les conditions environnementales des fromages au lait cru. Jusqu'à présent, ces travaux n'ont présenté que l'association STEC-globules gras dans un environnement physico-chimique proche du lait ou assimilé. Dans le cadre du projet Adhé-coli, un volet plus orienté sur l'affinité des STEC en modèle fromager a été développé. Lors de la transformation du lait en fromage, les propriétés physico-chimiques évoluent au cours du temps en fonction des technologies fromagères : acidification lors de l'étape de caillage, une baisse de l'activité de l'eau, augmentation de la teneur en sel et une diminution de la quantité d'oxygène disponible au cœur du fromage en fin d'affinage (D'Amico and Donnelly, 2017; Ong et al., 2017). Ces modifications peuvent fortement impacter la physiologie de la bactérie, l'expression de protéines de surface et par conséquent l'association des STEC avec les globules gras.

À noter également que le fromage au lait cru présente une microflore quantitativement beaucoup plus riche que le lait cru et peut impacter davantage la compétition pour les sites adhésifs des STEC sur les globules gras. De plus, la structure supramoléculaire des globules gras dans les fromages dépend fortement du procédé utilisé. Autrement dit, les globules gras n'auront pas la même structure entre un Camembert et un Emmental (Lopez, 2005). Il est également important de souligner qu'après la fabrication des fromages, les globules gras sont piégés au sein du réseau protéique de caséine, pouvant cacher l'accès des composants de la MFGM aux bactéries.

Avant toute chose, l'association STEC-globules gras devrait être évaluée dans les conditions physico-chimiques du processus digestif. Nous savons, d'après les travaux de la littérature, que les glycoconjugués de la MFGM résistent globalement bien à la digestion gastro-intestinale (Le et al., 2012; Tai et al., 2022). Par contre, l'expression des protéines

adhésives des STEC est hautement régulée dans le tractus gastro-intestinal et les facteurs nécessaires à l'association aux globules gras ne sont peut-être pas exprimés (Barnett Foster, 2013).

Une étude pourrait être menée pour évaluer le devenir de l'association STEC-globules gras après ingestion et les conditions favorables de l'adhésion des STEC aux globules gras dans le système intestinal. Par exemple, il serait envisageable d'utiliser un système de simulation de la digestion humaine, comme réalisé dans cette étude sur l'estimation de la survie des STEC dans les fromages au lait cru (Miszczycha et al., 2014). Couplées à de l'imagerie et à des tests d'adhésion cellulaire, ces expérimentations pourraient apporter de nouvelles informations cruciales sur la faisabilité de l'inhibition de l'adhésion des STEC au niveau intestinal.

B. Développement de traitements préventifs et/ou curatifs contre les STEC

Dans une vision plus lointaine, les composants des globules gras impliqués dans cette modulation pourraient être utilisés comme traitement contre les STEC qui seraient alors dans l'impossibilité de coloniser la barrière intestinale et de produire la Stx en forte quantité. Les souches STEC non adhérentes se retrouveraient alors éloignées de l'épithélium intestinal et serait rapidement éliminées dans les selles. Les stratégies anti-adhésives ont fait leurs preuves notamment dans les infections des voies urinaires : des dérivés de l' α -D-mannose sont décrits comme inhibiteurs efficaces de l'adhésion FimH des UPEC (Sarshar et al., 2020).

Plusieurs types de stratégies ont été décrits dans le développement de thérapies anti-adhésives (**Figure 22**): les inhibiteurs compétitifs qui peuvent imiter les adhésines bactériennes (classe I) ou les récepteurs des cellules hôtes (classe II), les molécules qui inhibent la biosynthèse ou la présentation en surface des adhésines (classe III) ou des récepteurs de l'hôte (classe IV), et enfin, l'utilisation d'anticorps ciblant les adhésines bactériennes (classe V).

La MFGM semble agir plutôt comme un inhibiteur compétitif des adhésines bactériennes (classe I). Toutefois, ce type de stratégie présente des inconvénients. La présence de multiples sites d'adhésions, la faible affinité des récepteurs libres pour les ligands bactériens, la présence d'épitopes communs avec les protéines humaines ainsi que l'absence de méthodes appropriées pour délivrer les inhibiteurs constituent un obstacle majeur. Il est aussi possible que des mutations se produisent et affectent l'efficacité des composés anti-adhésion (Asadi et al., 2019).

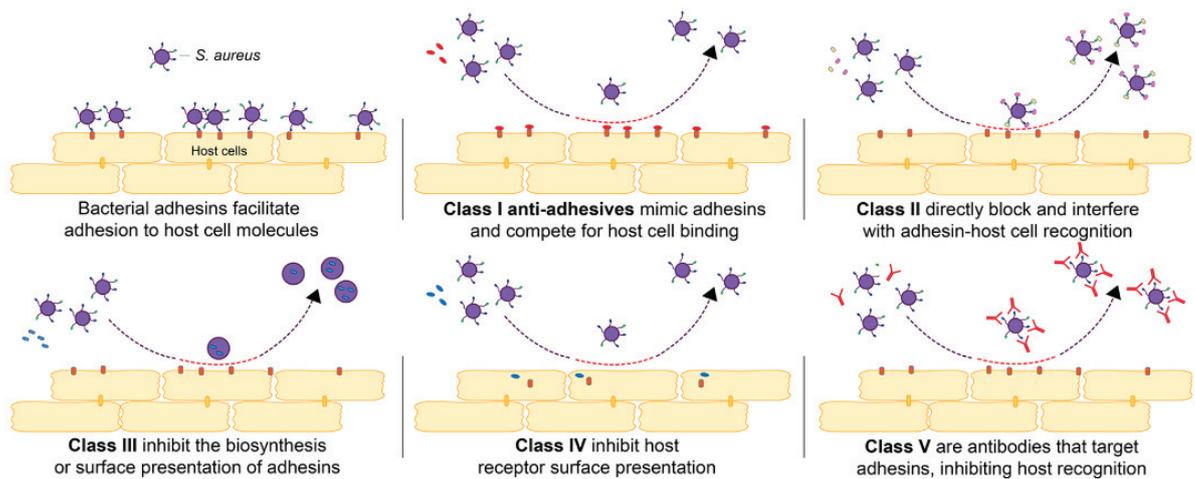


Figure 22. Aperçu schématique des stratégies anti-adhésives bactériennes. Le premier panneau (en haut à gauche) représente l'adhésion d'une bactérie à sa cellule hôte. Les panneaux suivants décrivent les différentes classes d'anti-adhésifs : les inhibiteurs compétitifs qui peuvent imiter les adhésines bactériennes (classe I) ou les récepteurs des cellules hôtes (classe II), les molécules qui inhibent la biosynthèse ou la présentation en surface des adhésines (classe III) ou des récepteurs de l'hôte (classe IV), et enfin, l'utilisation d'anticorps ciblant les adhésines bactériennes (classe V) (d'après Leonard et al., 2019).

Par ailleurs, une inhibition ciblée de l'expression de facteurs de virulence comme les systèmes d'assemblage des pili ou du système de sécrétion du type 3 (classe 3) pourrait être envisagée. En ciblant directement un facteur de virulence spécifique à l'agent pathogène, l'action de l'anti-infectieux limite les effets contre la communauté microbienne résidente. Des travaux ont montré que la MFGM régulait l'expression des gènes *stx* et du gène flagellaire *fliC* de la souche *E. coli* O157:H7 EDL933 (Tellez et al., 2012). Vue sous un autre angle, la modulation de la pathogénicité des STEC pourrait être due à des régulations génétiques, abaissant la virulence des souches. Des travaux seraient nécessaires pour comprendre davantage quelles régulations sont opérées en présence de MFGM.

L'utilisation de stratégies anti-adhésives nécessite une connaissance précise des récepteurs/ligands des STEC et de leur chronologie d'expression, qui ne sont pas encore entièrement connus. En effet, il semblerait qu'aucune molécule anti-infectieuse agissant directement sur les STEC ne soit en essai clinique. Par contre, d'autres molécules en développement ciblent plutôt la shiga toxine. La neutralisation de la shiga toxine est indispensable à un rétablissement rapide du patient et sans séquelle. Dans le cas de formes sévères de SHU avec atteinte extra-rénale, la société française de pédiatrie recommande l'utilisation de l'Eculizumab (SOLIRIS®), un anticorps monoclonal inhibiteur de la fraction C5 du complément. De nombreux essais cliniques ayant pour objectif d'évaluer d'autres molécules au mode d'action similaire sont en cours (Ort et al., 2020).

Enfin, des stratégies d'immunothérapie visent à neutraliser la toxine dans la circulation sanguine et d'empêcher son interaction avec le récepteur spécifique. L'utilisation de colostrum bovin contenant des anticorps anti-Stx ou d'un récepteur synthétique analogue au récepteur de la toxine de Shiga (Stx) (Synsorb Pk) n'ont pas montré d'efficacité (Imdad et al., 2021). L'Ertoxazumab, un anticorps monoclonal qui se lie à la sous-unité B de la toxine Stx2, présente des résultats intéressants mais d'autres études sont encore nécessaires (Moxley et al., 2017; Imdad et al., 2021). Quant aux anticorps anti-Stx connus sous le nom Shigamabs (Synsorb®), les résultats sont également prometteurs, mais là encore, des données complémentaires sont nécessaires avant utilisation (CNR des microangiopathies thrombotiques, 2021).

C. Les mesures de prévention contre les STEC tout au long de la chaîne agro-alimentaire

À ce jour, il n'existe pas de solution idéale pour éliminer spécifiquement les STEC des produits alimentaires, ni pour traiter les infections humaines. Dans l'attente de solutions innovantes, la diminution du risque STEC lié à l'alimentation ne peut se faire qu'à travers des mesures de prévention et de surveillance tout au long de la chaîne de production alimentaire. Ce sont des mesures généralement simples à appliquer, peu coûteuses et efficaces. Le guide de bonnes pratiques d'hygiène (GBPH) et les principes de l'HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*) constituent le socle de la plupart des systèmes de maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments.

Ces mesures doivent être mises en œuvre tout au long de la chaîne de production alimentaire de la filière concernée, à savoir pour la filière lait : l'élevage, la traite et le transport du lait, la transformation, la distribution et la consommation (**Figure 23**). Les industriels et les producteurs ont donc un rôle essentiel dans la maîtrise des STEC dans les matières premières et les produits transformés et commercialisés. En cas d'une contamination avérée, la mise en place de mesures de prophylaxie, comme la gestion et le retrait rappel des lots, est requise.

Ces mesures préventives s'accompagnent d'une surveillance des STEC tout au long de la chaîne de production alimentaire pour anticiper les crises sanitaires, en détectant précocement la présence de souches ou l'émergence de nouveaux pathotypes. Cette surveillance a donc vocation à faciliter la réactivité et l'adaptation des acteurs aux situations défavorables, parfois complexes à élucider, à la ferme, à l'usine et lors de la distribution des aliments (Plateforme de Surveillance de la Chaîne Alimentaire, 2022).

Aucune mesure universelle n'existe à ce jour, mais certaines permettent néanmoins de maîtriser le mieux possible la bactérie au sein de la filière. Des travaux développés par le Codex Alimentarius visent à établir des recommandations internationales pour la maîtrise des STEC dans différentes filières dont celle du lait et produits au lait cru. Ainsi, certaines solutions sont proposées de l'élevage à la consommation des produits finis par les consommateurs (FAO and WHO, 2021).

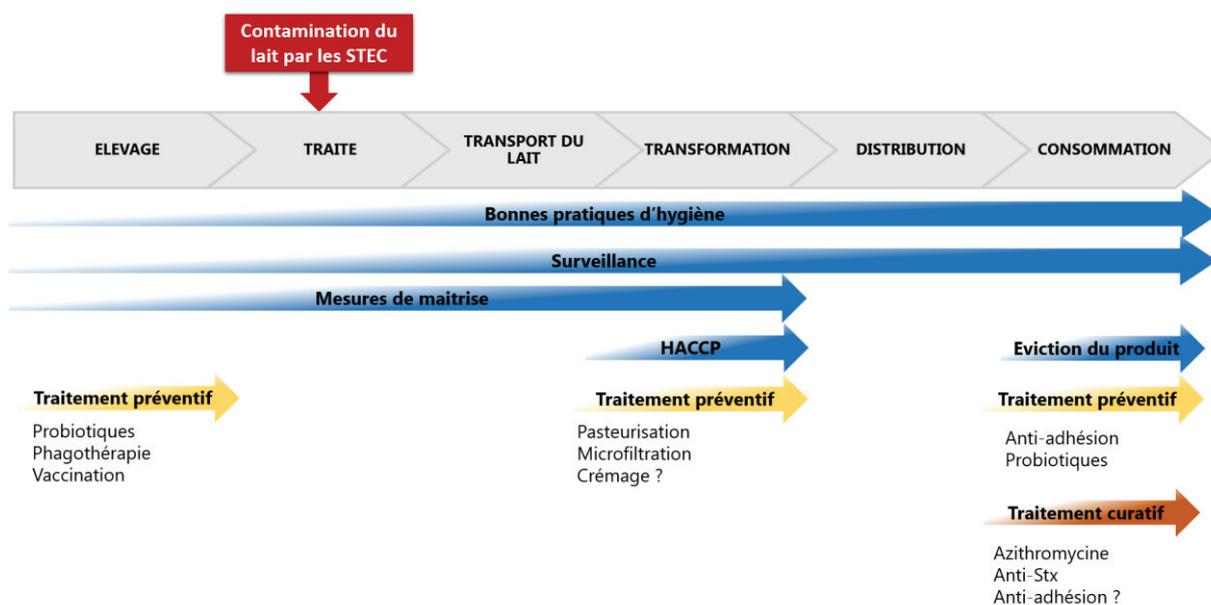


Figure 23. Les différents maillons de la chaîne de production laitière et les moyens de maîtrise préventifs et curatifs contre les STEC. Les stratégies préventives, dont l'addition de probiotiques ou de phages contre les STEC dans l'alimentation des animaux, sont au stade de la recherche et du développement. Pour l'homme, aucun traitement préventif ou curatif spécifique aux STEC n'est disponible, à ce jour. Le développement de molécules inhibitrices des shiga toxines ou de leur action sont au cœur de la recherche en particulier via l'immunothérapie. L'utilisation de molécules inhibitrices de l'adhésion des STEC à la barrière intestinale est une voie prometteuse, de par l'absence d'effet sur la viabilité, la perméabilité membrane, la lyse cellulaire et l'expression des shiga toxines des STEC.

C.1. Elevage

Ces mesures consistent à limiter la présence et la circulation des STEC dans les fermes pour réduire le plus possible la contamination des produits. Parmi les recommandations pour maîtriser les STEC dans les élevages, on peut citer des mesures simples et assez efficaces comme : minimiser le nombre d'animaux et leur contact, en particulier ceux âgés de 12 à 30 mois (Henry et al., 2019; Tamminen et al., 2019; Engelen et al., 2021), séparer les animaux porteurs de STEC et/ou excréteur de STEC du reste du troupeau, surveiller l'environnement

des enclos (Browne et al., 2018), introduire d'autres espèces (Henry et al., 2019). Les résultats d'une étude suggèrent que les veaux se toilettant activement et interagissant avec le troupeau ont un risque plus élevé de colonisation par des souches STEC O157:H7 que les veaux en mauvais état (diarrhée, mauvais remplissage du rumen, mauvais score de l'état corporel, écoulement nasal) (Tamminen et al., 2020).

Une vigilance particulière doit être menée au niveau de la traite. C'est à cette étape que la contamination du lait par les STEC se fait majoritairement. Le nettoyage et la désinfection des trayons et des appareils entre chaque animal avec un biocide homologué est recommandé pour limiter la contamination du lait et la contamination croisée des animaux. Des procédures d'hygiène régulières doivent également être mises en place au niveau des machines à traire.

Une cure d'antimicrobiens naturels dans l'alimentation des troupeaux a été envisagée comme solution préventive (Stratakos et al., 2019). L'utilisation de probiotiques a également été proposée mais les résultats des études sont contradictoires (Wisener et al., 2015; Brown et al., 2020; Dewsbury et al., 2021). La stratégie vaccinale contre les souches STEC O157:H7 est disponible (VIDO-InterVac) mais elle ne confère pas de protection contre la colonisation des bovins par les sérotypes non-O157:H7, dont O26:H11 et O103:H2 qui sont de plus en plus responsables d'infections humaines. Ces types d'approches préventives contre les STEC ne sont pas autorisés en Europe.

C.2. Collecte du lait

Le respect de la chaîne du froid est l'élément central lors de la collecte du lait de la ferme à l'usine. Le lait doit être transporté dans des camions réfrigérés et stocké à basse température dès l'arrivée à l'usine de transformation (CNIEL, 2020).

C.3. Transformation et distribution.

Parmi les recommandations, on peut citer :

- L'analyse systématique du lait cru avant fabrication (bactéries indicatrices et la recherche éventuelle de bactéries pathogènes),
- Le respect des règles d'hygiène par le personnel lors de la manipulation des produits en cours de fabrication (GBPH),
- Le nettoyage des surfaces avec des désinfectants bactéricides,
- Le respect de la chaîne du froid pour éviter la prolifération des STEC,
- Limiter les contaminations croisées de produits,
- Un système de traçabilité conforme,

- La recherche de souches STEC dans le produit au pic de prolifération des souches et/ou dans le produit fini, et
- La réalisation d'analyses complémentaires lorsque cela est nécessaire.

En cas de présence de souches STEC dans le lait, la filière peut pasteuriser le lait et le transformer hors circuit « lait cru », si mentionné dans son cahier des charges. À ce jour, pour éliminer les STEC la seule mesure efficace est d'appliquer un traitement thermique (CNIEL et al., 2015).

Si des produits distribués présentent une non-conformité et sont sur le marché, les autorités compétentes engagent une procédure de retrait et de rappel des produits concernés (DGCCRF et al., 2021). Pour les produits non distribués, le fabricant doit réaliser des analyses complémentaires sur les lots des fabrications proches et produits avec le même lait. Les produits ne peuvent pas être commercialisés.

C.4. Consommateurs

La **Figure 24**, extraite du rapport qui fait suite à différentes épidémies à STEC en France, présente les mesures de prévention à prendre contre les STEC. Les autorités de santé publique française en lien avec l'alimentation recommandent aux personnes vulnérables (enfants, personnes âgées, immunodéprimées, femmes enceintes), de ne pas consommer de produit au lait cru ou de favoriser certaines technologies fromagères moins à risque, comme les pâtes pressées cuites (**Figure 25**).

Encadré 1

Préconisations concernant la prévention des infections à STEC (*Escherichia coli* producteur de shigatoxine)

- Les viandes, et surtout la viande hachée de bœuf, mais aussi les préparations à base de viande hachée, doivent être bien cuites à cœur (et non pas rosées à cœur).
- Le lait cru, les fromages à base de lait cru et les produits laitiers fabriqués à partir de lait cru ne doivent pas être consommés par les enfants âgés de moins de 5 ans ; préférer les fromages à pâte pressée cuite (type Emmental, Comté, Gruyère, Beaufort), les fromages fondus à tartiner et les fromages au lait pasteurisé.
- Les préparations à base de farine (pizza/pâte à cookies/gâteau/à tarte...) ne doivent pas être consommées crues ou peu cuites.
- Les légumes, la salade, les fruits et les herbes aromatiques, en particulier ce qui va être consommé cru, doivent être soigneusement lavés avant consommation, après épluchage le cas échéant.
- Le lavage des mains doit être systématique avant la préparation des repas.
- Les aliments crus doivent être conservés séparément des aliments cuits ou prêts à être consommés.
- Les plats cuisinés et les restes alimentaires doivent être rapidement mis au réfrigérateur et suffisamment réchauffés et consommés rapidement.
- Les ustensiles de cuisine (surtout lorsqu'ils ont été en contact préalablement avec des aliments crus), ainsi que les plans de travail, doivent être soigneusement lavés.
- Les enfants ne doivent pas boire d'eau non traitée (eau de puits, torrent, etc.) et éviter d'en avaler lors de baignades (lac, étang, etc.).
- Il faut éviter le contact des très jeunes enfants (âgés < 5 ans) avec les vaches, veaux, moutons, chèvres, daims, etc., et leur environnement ; en cas de contact avec ces animaux, le lavage des mains doit être systématique.

Figure 24. Préconisations concernant la prévention des infections à STEC diffusées par des autorités de santé françaises dont Santé publique France et le Ministère de santé (d'après Fila and Jones, 2022)

LE SAVIEZ-VOUS? Le lait cru peut présenter un risque important pour les jeunes enfants



Les jeunes enfants et particulièrement ceux de moins de 5 ans ne doivent pas consommer de lait cru et de fromages au lait cru*

***Sauf fromages au lait cru à pâte pressée cuite**
ex. Gruyère, Comté, Emmental, Beaufort...

Vérifiez l'étiquette ou demandez conseil à votre commerçant

AGRICULTURE.GOUV.FR



ALIMENTATION.GOUV.FR

Figure 25. Communication du ministère de l'Agriculture à propos de lait consommation des produits au lait cru pour les enfants de moins de 5 ans.

Conclusion générale

La sécurité sanitaire des aliments, l'un des axes fondamentaux de la santé publique, n'est pas sans faille. Chaque année, 1 personne sur 10 dans le monde développerait une infection liée à la consommation d'aliments contaminés (WHO, 2020). Les salmonelloses et les listérioses, connues de tous, laissent de plus en plus de place aux infections incriminant les *Escherichia coli* producteurs de shiga toxines (STEC). Mieux surveillées, mieux détectées et mieux diagnostiquées, les infections à STEC sont au centre des épidémies du début de ce XXI^{ème} siècle. Les retraits rappels et la survenue d'épidémies de grande envergure plus récurrents pourraient générer une perte de confiance des consommateurs et donc une diminution de la consommation de certains aliments. Les conséquences économiques pour les filières agroalimentaires touchées, déjà inquiètes dans le contexte actuel, pourraient être significatives, compte tenu de la place des élevages bovins et laitiers en France.

Connus pour leurs bienfaits sur la santé du consommateur depuis des siècles, les produits au lait cru regorgent de molécules bioactives dont les mécanismes sur l'organisme humain restent à élucider. Parmi ces molécules, les composants protéiques, lipidiques et glycosylés ancrés dans la membrane des globules gras sont de plus en plus mis en exergue pour leurs vertus. Leur action sur la modulation de la pathogénicité des STEC est connue, mais les mécanismes moléculaires et physiologiques sont peu élucidés. Au cours de ce projet, nous avons, d'une part, évalué l'association des STEC avec les globules gras du lait cru et la réduction du niveau des STEC dans le lait cru via l'élimination de la matière grasse et d'autre part, identifié la nature de l'association STEC-globules gras et les composants moléculaires des STEC impliqués dans cette association.

Nous avons confirmé une réelle association du pathotype STEC aux globules gras du lait cru et démontré le caractère souche et sérotype dépendant de cette affinité. Nous avons mis en avant l'implication des protéines de surface des STEC dans cette association et le rôle probable qu'elles jouent dans la spécificité du mécanisme propre à chaque souche. Nous concluons que l'association STEC-globules gras implique des interactions spécifiques qui impliquent la reconnaissance de différents épitopes présents à la surface de la membrane des globules gras par diverses adhésines bactériennes. L'identification des acteurs moléculaires de l'association devrait être poursuivie en considérant chaque souche indépendamment.

Dans ce contexte, les protéines de la membrane de globules gras jouent alors le rôle de récepteurs leurres, retenant les STEC éloignés de leur site d'adhésion au niveau de la muqueuse colique. La prévention de l'adhésion bactérienne est maintenant considérée

comme une stratégie prometteuse pour réduire l'apparition des maladies infectieuses, sans l'utilisation d'antibiotiques. L'utilisation du lait cru comme modèle d'étude montre comment la nature continue à être au centre de la recherche scientifique et à fournir des pistes pour le développement d'anti-infectieux.

Toutefois, les preuves scientifiques en modèle *in vivo* de l'action des globules gras, de leur membrane et des composants qui y sont ancrées sont manquantes. Consolider l'effet préventif apporté par les globules gras contre les STEC semble être une priorité. Des questions demeurent : Quel est le réel effet de la consommation de globules gras sur les infections à STEC et l'adhésion des cellules bactériennes à la barrière intestinale ? Quelles technologies fromagères préservent les propriétés anti-adhésives des composés de la membrane des globules gras ? Est-ce que l'administration de membranes de globules gras pures sous forme de compléments alimentaires serait suffisante ? À quelle dose ? Cela serait-il efficace chez les jeunes enfants ?

En parallèle, il semble primordial de consolider les connaissances de toutes les facettes de cette interaction, incluant les régulations génétiques en présence des globules gras, l'impact de la digestion et l'intégration de cette association à l'échelle du microbiome intestinal humain. Par ailleurs, une meilleure compréhension de la pathogénie des STEC lors d'une infection chez les jeunes enfants, pour lesquels les conséquences sont graves, permettrait de comprendre le terrain favorable à l'exécution des actions dévastatrices des shiga toxines. Les futures recherches devraient s'y concentrer ; l'inhibition de l'action des shiga toxines est peut-être l'une des priorités du corps scientifique et médical pour répondre rapidement et en partie à la problématique des STEC.

J'espère que ces travaux et leur implication dans le contexte sanitaire et économique actuel vous auront convaincu de l'originalité de la matière grasse du lait cru et de son pouvoir potentiel dans la prévention des infections. Au cours de ce projet, j'ai pu appréhender une partie du contexte sanitaire lié aux pathogènes alimentaires et les conséquences qui touchent les filières agro-alimentaires. Le partage d'expériences d'exploitants agricoles ayant géré le risque STEC montre ô combien ces professionnels sont démunis face à ce pathogène. Malgré toutes les mesures d'hygiène et les recommandations des autorités compétentes, le risque zéro de contamination n'existe pas. Les produits au lait cru et autres produits peu transformés sont en danger, il paraît urgent de continuer les actions pour préserver nos terres, notre alimentation et notre santé.

Liste des travaux liés au projet de recherche

A. Publications

Bagel A. & Sergentet D. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Milk Fat Globules. *Microorganisms*, 10, 496. (2022).

Bagel A, Delignette-Muller ML, Lopez C, Michel V, Sergentet-Thevenot D, Douëllou T. Strain- and serotype-dependent affinity of Shiga Toxin-Producing-*Escherichia coli* for bovine milk fat globules. *Journal of Dairy Science*, 105, 8688–8704. (2022).

Bagel A, Lopez C, David-Briand E, Michel V, Douëllou T, Sergentet-Thevenot D. Serotype-dependent adhesion of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to bovine milk fat globule membrane proteins. *Frontiers in Microbiology*. (Accepté). (2022).

Bagel A, Bouvier M, Canizares B, Hamadou B, Courcol L, Lopez C, Michel V, Douëllou T, Sergentet D. Surface proteins of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* mediate association to raw milk fat globules membrane proteins. (*En préparation*).

B. Communications orales

« **Tropisme des STEC pour la phase grasse du lait cru** ». 14/11/2019. GT-STEC. CNIEL. Paris. (Orateur).

« **L'association STEC-globules gras du lait cru en modèle lait cru et fromages au lait cru** ». 19/11/20. GT-pathogènes. CNIEL. Visioconférence. (Orateur).

« **L'association STEC-Globules gras : une interaction spécifique ?** » 08/10/21. GT-pathogènes. CNIEL. Visioconférence. (Orateur).

« **Vers une meilleure compréhension de l'association STEC – Globules gras du lait cru et ses conséquences sur la physiopathologie des STEC et leur détection dans les aliments** » 11/03/22. Journée d'échanges et d'informations organisée par le laboratoire national de référence (LNR) des *Escherichia coli* pathogènes y compris STEC pour le réseau officiel STEC. Session 1 : actualités scientifiques. (Orateur).

C. Congrès

VTEC 2021, Banff. « **Milk Fat Globule Membrane proteins are involved in the association of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and milk fat globule** ». Abstract. Congrès annulé.

D. Rapports d'activités

Rapport d'activité du projet Adhé-coli n°1. Bilan des activités de recherche menées entre avril 2019 et janvier 2020. 39p.

Rapport d'activité du projet Adhé-coli n°2. Bilan des activités de recherche menées entre février 2020 et janvier 2021. 67p.

Rapport d'activité du projet Adhé-coli n°3 (intermédiaire). Bilan des activités de recherche menées entre février 2021 et décembre 2021. 18p.

Rapport d'activité du projet Adhé-coli n°4. Rapport final des activités de recherche du projet Adhé-coli. (Prévu pour le dernier semestre 2022)

Fiche projet Adhé-coli. Vulgarisation des résultats du projet Adhé-coli à destination des professionnels de la filière et du CNIEL. (Prévu pour le dernier semestre 2022)

E. Activité complémentaire

Vulgarisations scientifiques. Rédaction d'une trentaine de résumés de publication dans le cadre de la veille scientifique du CNIEL. Ces résumés ont fait l'objet d'une diffusion auprès des professionnels du réseau du CNIEL.

Références bibliographiques

- Aalaei, K., M. Rayner, and I. Sjöholm. 2019. Chemical methods and techniques to monitor early Maillard reaction in milk products; A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59:1829–1839. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2018.1431202>.
- Adam, A.C., M. Rubio-Teixeira, and J. Polaina. 2005. Lactose: The Milk Sugar from a Biotechnological Perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44:553–557. <http://dx.doi.org/10.1080/10408690490931411>.
- AFSSA. 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC).
- Ageorges, V., R. Monteiro, S. Leroy, C.M. Burgess, M. Pizza, F. Chaucheyras-Durand, and M. Desvaux. 2020. Molecular determinants of surface colonisation in diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC): from bacterial adhesion to biofilm formation. *FEMS Microbiol. Rev.* 44:314–350. <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuaa008>.
- Agger, M., F. Scheutz, S. Villumsen, K. Mølbak, and A.M. Petersen. 2015. Antibiotic treatment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection: a systematic review and a proposal. *J. Antimicrob. Chemother.* 70:2440–2446. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkv162>.
- Aleksandrowicz, A., M.M. Khan, K. Sidorcuk, M. Noszka, and R. Kolenda. 2021. Whatever makes them stick – Adhesins of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 257:109095. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109095>.
- Alhussien, M.N., and A.K. Dang. 2018. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Vet. World* 11:562–577. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2018.562-577>.
- Allaire, J.M., S.M. Crowley, H.T. Law, S.-Y. Chang, H.-J. Ko, and B.A. Vallance. 2018. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* 39:677–696. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>.
- Álvarez-Suárez, M.-E., A. Otero, M.-L. García-López, G. Dahbi, M. Blanco, A. Mora, J. Blanco, and J.A. Santos. 2016. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *Int. J. Food Microbiol.* 236:148–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.035>.
- Anderson, J.F. 1909. The Relative Proportion Of Bacteria In Top Milk (Cream Layer) And Bottom Milk (Skim Milk), And Its Bearing On Infant Feeding. *J. Infect. Dis.* 6:392–400. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/6.3.392>.
- ANSES. 2017. Avis relatif à la détection des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC) considérés comme hautement pathogènes en filière viande hachée bovine. Maisons-Alfort, France.
- ANSES. 2019. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments / *E. coli* entérohémorragiques (EHEC).
- ANSES - Les toxi-infections alimentaires collectives. 2013. . Accessed September 1, 2022. <https://www.anses.fr/fr/content/les-toxi-infections-alimentaires-collectives-tiac>.
- AP-HP, (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris). 2020. Microangiopathies thrombotiques. Accessed August 9, 2022. <https://maladiesrares-necker.aphp.fr/microangiopathies-thrombotiques/>.
- Asadi, A., S. Razavi, M. Talebi, and M. Gholami. 2019. A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases. *Infection* 47:13–23. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-018-1222-5>.
- Bagel, A., and D. Sergentet. 2022. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Milk Fat Globules. *Microorganisms* 10:496. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10030496>.
- Barnett Foster, D. 2013. Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. *Virulence* 4:315–323. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.24318>.
- Baylis, C.L. 2009. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Int. J. Dairy Technol.* 62:293–307. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00504.x>.
- Bergström, J.H., G.M.H. Birchenough, G. Katona, B.O. Schroeder, A. Schütte, A. Ermund, M.E.V. Johansson, and G.C. Hansson. 2016. Gram-positive bacteria are held at a distance in the colon mucus by the lectin-like protein ZG16. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113:13833–13838. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1611400113>.
- Berne, C., C.K. Ellison, A. Ducret, and Y.V. Brun. 2018. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat. Rev. Microbiol.* 16:616–627. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0057-5>.
- Betts, G.D. 2000. Controlling *E. coli* O157. *Nutr. Food Sci.* 30:183–186. <http://dx.doi.org/10.1108/00346650010330216>.
- Bhinder, G., J.M. Allaire, C. Garcia, J.T. Lau, J.M. Chan, N.R. Ryz, E.S. Bosman, F.A. Graef, S.M. Crowley, L.S. Celiberto, J.C. Berkman, R.A. Dyer, K. Jacobson, M.G. Surette, S.M. Innis, and B.A. Vallance. 2017. Milk Fat Globule Membrane Supplementation in Formula Modulates the Neonatal Gut Microbiome and Normalizes Intestinal Development. *Sci. Rep.* 7:45274. <http://dx.doi.org/10.1038/srep45274>.
- Bhunja, A.K. 2018. *Escherichia coli*. A.K. Bhunia, ed. Food Science Text Series. Springer, New York, NY.
- Bielaszewska, M., A.W. Friedrich, T. Aldick, R. Schürk-Bulgrin, and H. Karch. 2006. Shiga Toxin Activatable by Intestinal Mucus in *Escherichia coli* Isolated from Humans: Predictor for a Severe Clinical Outcome. *Clin. Infect. Dis.* 43:1160–1167. <http://dx.doi.org/10.1086/508195>.
- Bielaszewska, M., C. Rüter, A. Bauwens, L. Greune, K.-A. Jarosch, D. Steil, W. Zhang, X. He, R. Lloubes, A. Fruth, K.S. Kim, M.A. Schmidt, U. Dobrindt, A. Mellmann, and H. Karch. 2017. Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: Intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLOS Pathog.* 13:e1006159. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006159>.
- Bijl, E., T. Huppertz, H. van Valenberg, and C. Holt. 2019. A quantitative model of the bovine casein micelle: ion equilibria and calcium phosphate sequestration by individual caseins in bovine milk. *Eur. Biophys. J.* 48:45–59. <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-018-1330-2>.
- Bird, J. 1991. Cream separation. *Int. J. Dairy Technol.* 44:61–63. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.1991.tb00638.x>.
- Bizot, E., A. Cointe, P. Bidet, P. Mariani-Kurkdjian, C.A. Hobson, C. Courroux, S. Liguori, A. Bridier-Nahmias, M. Magnan, M. Merimèche, F. Caméléna, B. Berçot, F.-X. Weill, S. Lefèvre, S. Bonacorsi, and A. Birgy. 2022. Azithromycin Resistance in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in France between 2004 and 2020 and Detection of *mef(C)*-*mph(G)* Genes. *Antimicrob. Agents*

- Chemother. 66:e01949-21. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01949-21>.
- Boor, K.J., M. Wiedmann, S. Murphy, and S. Alcaine. 2017. A 100-Year Review: Microbiology and safety of milk handling. *J. Dairy Sci.* 100:9933–9951. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-12969>.
- Boutonnier, J.-L. 2008. Matière grasse laitière - Composition, organisation et propriétés. *Tech. Ing. Filière Prod. Prod. Orig. Anim.*
- Bozcal, E. 2019. Insight into the Mobilome of *Escherichia Coli*. *IntechOpen*.
- Brigotti, M., P.L. Tazzari, E. Ravanelli, D. Carnicelli, L. Rocchi, V. Arfilli, G. Scavia, F. Minelli, F. Ricci, P. Pagliaro, A.V.S. Ferretti, C. Pecoraro, F. Paglialonga, A. Edefonti, M.A. Procaccino, A.E. Tozzi, and A. Caprioli. 2011. Clinical Relevance of Shiga Toxin Concentrations in the Blood of Patients With Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30:486–490. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e3182074d22>.
- Brisson, G., H.F. Payken, J.P. Sharpe, and R. Jiménez-Flores. 2010. Characterization of *Lactobacillus reuteri* Interaction with Milk Fat Globule Membrane Components in Dairy Products. *J. Agric. Food Chem.* 58:5612–5619. <http://dx.doi.org/10.1021/jf904381s>.
- Brown, T.R., T.S. Edrington, K.J. Genovese, H.L. He, R.C. Anderson, and D.J. Nisbet. 2020. Evaluation of the Efficacy of Three Direct Fed Microbial Cocktails to Reduce Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Naturally Colonized Cattle and Fecal Shedding and Peripheral Lymph Node Carriage of *Salmonella* in Experimentally Infected Cattle. *J. Food Prot.* 83:28–36. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-208>.
- Browne, A.S., A.C. Midwinter, H. Withers, A.L. Cookson, P.J. Biggs, J.C. Marshall, J. Hathaway, S. Hathaway, N.A. Haack, R.N. Akhter, and N.P. French. 2018. Molecular Epidemiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) on New Zealand Dairy Farms: Application of a Culture-Independent Assay and Whole-Genome Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:e00481-18. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00481-18>.
- Brugère, H., F. Auvray, P. Mariani-Kurkdjian, L.-A. King, and E. Loukiadis. 2012. *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC). *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment.* 50:7.
- Bruyand, M., P. Mariani-Kurkdjian, M. Gouali, H. de Valk, L.A. King, S. Le Hello, S. Bonacorsi, and C. Loirat. 2018. Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Médecine Mal. Infect.* 48:167–174. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2017.09.012>.
- Bruyand, M., P. Mariani-Kurkdjian, S. Le Hello, L.-A. King, D. Van Cauteren, S. Lefevre, M. Gouali, N. Jourdan-da Silva, A. Mailles, and M.-P. Donguy. 2019. Paediatric haemolytic uraemic syndrome related to Shiga toxin producing *Escherichia coli*, an overview of 10 years of surveillance in France, 2007 to 2016. *Eurosurveillance* 24:1800068.
- Buzby, J.C., L. Hannah Gould, M.E. Kendall, T.F. Jones, T. Robinson, and D.P. Blayney. 2013. Characteristics of Consumers of Unpasteurized Milk in the United States. *J. Consum. Aff.* 47:153–166. <http://dx.doi.org/10.1111/joca.12001>.
- Cabrera-Diaz, E., T.M. Moseley, L.M. Lucia, J.S. Dickson, A. Castillo, and G.R. Acuff. 2009. Fluorescent protein-marked *Escherichia coli* biotype I strains as surrogates for enteric pathogens in validation of beef carcass interventions. *J. Food Prot.* 72:295–303. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-72.2.295>.
- Cain, A.K., L. Barquist, A.L. Goodman, I.T. Paulsen, J. Parkhill, and T. van Opijnen. 2020. A decade of advances in transposon-insertion sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 21:526–540. <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-020-0244-x>.
- Carpenter, E.P., K. Beis, A.D. Cameron, and S. Iwata. 2008. Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18:581–586. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2008.07.001>.
- Chaisri, U., M. Nagata, H. Kurazono, H. Horie, P. Tongtawe, H. Hayashi, T. Watanabe, P. Tapchaisri, M. Chongsanguan, and W. Chaicumpa. 2001. Localization of Shiga toxins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in kidneys of paediatric and geriatric patients with fatal haemolytic uraemic syndrome. *Microb. Pathog.* 31:59–67. <http://dx.doi.org/10.1006/mpat.2001.0447>.
- Chan, Y.S., and T.B. Ng. 2016. Shiga toxins: from structure and mechanism to applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:1597–1610. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-7236-3>.
- Chapman, P.A., A.T. Cerdán Malo, M. Ellin, R. Ashton, and M.A. Harkin. 2001. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *Int. J. Food Microbiol.* 64:139–150. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00453-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00453-0).
- Charby, J., P. Hébel, and S. Vaudaine. 2017. Les produits laitiers en France : évolution du marché et place dans la diète. *Cah. Nutr. Diététique* 5262:S1–S86. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-9960\(17\)30196-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-9960(17)30196-7).
- Chen, P.E., and B.J. Shapiro. 2015. The advent of genome-wide association studies for bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 25:17–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.03.002>.
- Cherla, R.P., S.-Y. Lee, P.L. Mees, and V.L. Tesh. 2006. Shiga toxin 1-induced cytokine production is mediated by MAP kinase pathways and translation initiation factor eIF4E in the macrophage-like THP-1 cell line. *J. Leukoc. Biol.* 79:397–407. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0605313>.
- Chong, Y., R. Fitzhenry, R. Heuschkel, F. Torrente, G. Frankel, and A.D. Phillips. 2007. Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157 : H7 - initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion ex vivo. *Microbiol. Read. Engl.* 153:794–802. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2006/003178-0>.
- CNIEL. 2020. La Sécurité Sanitaire : L'excellence Française. Accessed July 27, 2022. <https://www.filiere-laitiere.fr/fr/filiere-laitiere/securete-sanitaire-lexcellence-francaise>.
- CNIEL. 2021. L'économie laitière en chiffre - Edition 2021. CNIEL, Paris, France.
- CNIEL, ATALIA, and IDELE. 2015. Maitrise des STEC en filière laitière - Guide interprofessionnel.
- CNR des microangiopathies thrombotiques. 2021. Protocole national de diagnostic et de soins (PNDS) - Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU).
- Codex Alimentarius. 1999. Norme générale pour l'utilisation de termes de laiterie. Programme mixte FAO/OMS, Rome, Italy.
- Codex Alimentarius. 2004. Code d'usages en matière d'hygiène pour le lait et les produits laitiers. Programme mixte FAO/OMS, Rome, Italy.
- Cohen, M. 2017. Le lait humain est-il un aliment comme un autre ? La découverte. *Recherches*.
- Colello, R., A. Krüger, M.V. Velez, F. Del Canto, A.I. Etcheverría, R. Vidal, and N.L. Padola. 2019. Identification and detection of iha subtypes in LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from humans, cattle and food. *Heliyon* 5:e03015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03015>.
- Comerford, K.B., G.D. Miller, A.C. Boileau, S.N. Masiello Schuette, J.C. Giddens, and K.A. Brown. 2021. Global Review of Dairy Recommendations in Food-Based

- Dietary Guidelines. *Front. Nutr.* 8. <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2021.671999>.
- Corvaisier, M. 2016. Implication des co-activateurs transcriptionnels YAP/TAZ dans la régulation entre la croissance et la dormance tumorale des cellules du cancer colorectal: mécanismes moléculaires et perspectives thérapeutiques. Thesis. Université du Droit et de la Santé – Lille II.
- Croxen, M.A., R.J. Law, R. Scholz, K.M. Keeney, M. Wlodarska, and B.B. Finlay. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26:822–880. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00022-13>.
- Currie, A. 2018. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to aged raw milk Gouda cheese. *J Food Prot.* 81:325–331. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-283>.
- Currier, R.W., and J.A. Widness. 2018. A Brief History of Milk Hygiene and Its Impact on Infant Mortality from 1875 to 1925 and Implications for Today: A Review. *J. Food Prot.* 81:1713–1722. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-186>.
- D'Amico, D.J., and C.W. Donnelly. 2017. Chapter 22 - Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, P.D. Cotter, and D.W. Everett, ed. Academic Press, San Diego.
- Delbaere, N. 2008. Birth of the Dairy Industry and Persistence of Traditional Milk Economy in Northern France. *Rev. Nord* 375376:457–477.
- Dellaglio, F., J. Stadhouders, and G. Hup. 1969. Distribution of bacteria between the bottom, middle, and cream layers of creamed raw milk. *Neth Milk Dairy J* 23:140–145.
- Derrien, M., M.W. van Passel, J.H. van de Bovenkamp, R.G. Schipper, W.M. de Vos, and J. Dekker. 2010. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 1:254–268. <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.1.4.12778>.
- Dewsbury, D.M.A., N. Cernicchiaro, B. Depenbusch, T. g. Nagaraja, and D.G. Renter. 2021. Effectiveness of a Direct-Fed Microbial Product Containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in Reducing Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Commercial Feedlot Cattle. *Foodborne Pathog. Dis.* 18:16–23. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2020.2828>.
- DGCCRF, (Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes). 2017. Contamination à *Salmonella Agona* de Jeunes Enfants : Extension Des Mesures de Retrait-Rappel de Produits de Nutrition Infantile. Accessed August 10, 2022. <https://solidarites-sante.gouv.fr/archives/archives-presse/archives-communiqués-de-presse/article/contamination-a-salmonella-agona-de-jeunes-enfants-extension-des-mesures-de>.
- DGCCRF, (Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes), (Direction générale de la santé) DGS, and (Direction générale de l'alimentation) DGAL. 2021. Guide à la gestion des alertes à usage des exploitants du secteur alimentaire et de l'administration. Version révisée du 10/06/2021.
- Douëllou, T., S. Delannoy, S. Ganet, P. Fach, E. Loukiadis, M.C. Montel, and D. Sergentet-Thevenot. 2017a. Molecular characterization of O157:H7, O26:H11 and O103:H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 253:59–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.010>.
- Douëllou, T., W. Galia, S. Kerangart, T. Marchal, N. Milhau, R. Bastien, M. Bouvier, S. Buff, M.-C. Montel, and D. Sergentet-Thevenot. 2018. Milk Fat Globules Hamper Adhesion of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* to Enterocytes: In Vitro and in Vivo Evidence. *Front. Microbiol.* 9:947. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00947>.
- Douëllou, T., M.C. Montel, and D. Thevenot Sergentet. 2017b. Invited review: Anti-adhesive properties of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane-associated glycoconjugates against bacterial food enteropathogens. *J. Dairy Sci.* 100:3348–3359. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11611>.
- Eckhard, U., H. Bandukwala, M.J. Mansfield, G. Marino, J. Cheng, I. Wallace, T. Holyoak, T.C. Charles, J. Austin, C.M. Overall, and A.C. Doxey. 2017. Discovery of a proteolytic flagellin family in diverse bacterial phyla that assembles enzymatically active flagella. *Nat. Commun.* 8:521. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00599-0>.
- EFSA and ECDC, (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). 2021. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA J.* 19:e06971. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>.
- EFSA, E.F.S. 2011. Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France. *EFSA J.* 8:23. <http://dx.doi.org/10.2903/sp.efsa.2011.EN-176>.
- El-Zeini, H.M. 2006. Microstructure, rheological and geometrical properties of fat globules of milk from different animal species. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 56:147–154.
- Engelen, F., D. Thiry, B. Devleeschauwer, J. Mainil, L. De Zutter, and E. Cox. 2021. Occurrence of 'gang of five' Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups on Belgian dairy cattle farms by overshoe sampling. *Lett. Appl. Microbiol.* 72:415–419. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.13434>.
- Espie, E. 2006. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with fresh unpasteurized goat's cheese. *Epidemiol Infect* 134:143–146. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268805004887>.
- Etcheverría, A.I., and N.L. Padola. 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Virulence* 4:366–372. <http://dx.doi.org/10.4161/viru.24642>.
- Etienne-Mesmin, L., B. Chassaing, P. Sauvanet, J. Denizot, S. Blanquet-Diot, A. Darfeuille-Michaud, N. Pradel, and V. Livrelli. 2011. Interactions with M Cells and Macrophages as Key Steps in the Pathogenesis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections. *PLOS ONE* 6:e23594. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023594>.
- Euber, J.R., and J.R. Brunner. 1984. Reexamination of Fat Globule Clustering and Creaming in Cow Milk. *J. Dairy Sci.* 67:2821–2832. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81642-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81642-2).
- Evers, J.M., R.G. Haverkamp, S.E. Holroyd, G.B. Jameson, D.D.S. Mackenzie, and O.J. McCarthy. 2008. Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques. *Int. Dairy J.* 18:1081–1089. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.06.001>.
- Evershed, R.P., S. Payne, A.G. Sherratt, M.S. Copley, J. Coolidge, D. Urem-Kotsu, K. Kotsakis, M. Özdoğan, A.E. Özdoğan, O. Nieuwenhuysse, P.M.M.G. Akkermans, D. Bailey, R.-R. Andeescu, S. Campbell, S. Farid, I. Hodder, N. Yalman, M. Özbaşaran, E. Bıçakçı, Y. Garfinkel, T. Levy, and M.M. Burton. 2008. Earliest date for milk use in the Near East and southeastern

- Europe linked to cattle herding. *Nature* 455:528–531. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07180>.
- FAO and WHO. 2018. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring.
- FAO and WHO. 2019. Attributing illness caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) to specific foods. Microbiological Risk Assessment Series. Rome, Italy.
- FAO and WHO. 2021. Proposed draft guidelines for the control of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (stec) in raw beef, fresh leafy vegetables, raw milk and raw-milk cheeses, and sprouts. Codex Alimentarius Commission, CX/FH 22/52/7. FAO/WHO, Rome, Italy.
- Farfan, M.J., L. Cantero, R. Vidal, D.J. Botkin, and A.G. Torres. 2011. Long Polar Fimbriae of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Bind to Extracellular Matrix Proteins. *Infect. Immun.* 79:3744–3750. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.05317-11>.
- Farfan, M.J., and A.G. Torres. 2012. Molecular Mechanisms That Mediate Colonization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains. *Infect. Immun.* 80:903–913. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.05907-11>.
- Farrokh, C., K. Jordan, F. Auvray, K. Glass, H. Oppegaard, S. Raynaud, D. Thevenot, R. Condron, K. De Reu, A. Govaris, K. Heggum, M. Heyndrickx, J. Hummerjohann, D. Lindsay, S. Miszczycha, S. Moussiegt, K. Verstraete, and O. Cerf. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.* 162:190–212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>.
- Feng, L., B. Yang, Y. Xu, Y. Xiong, F. Wang, B. Liu, W. Yang, T. Yao, and L. Wang. 2022. Elucidation of a complete mechanical signaling and virulence activation pathway in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell Rep.* 39:110614. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110614>.
- Fila, M., and G. Jones. 2022. Prévention du syndrome hémolytique et urémique post diarrhée : rôle primordial du médecin de l'enfant. *Perfect. En Pédiatrie.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.perped.2022.05.001>.
- Foster, G.H., and V.L. Tesh. 2002. Shiga toxin 1-induced activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 in the human monocytic cell line THP-1: possible involvement in the production of TNF- α . *J. Leukoc. Biol.* 71:107–114. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.71.1.107>.
- FranceAgriMer. 2020. La consommation de produits laitiers en 2019.
- Frankel, G., O. Lider, R. Hershkoviz, A.P. Mould, S.G. Kachalsky, D.C.A. Candy, L. Cahalon, M.J. Humphries, and G. Dougan. 1996. The Cell-binding Domain of Intimin from Enteropathogenic *Escherichia coli* Binds to β 1 Integrins. *J. Biol. Chem.* 271:20359–20364. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.34.20359>.
- Fratamico, P.M., C. DebRoy, Y. Liu, D.S. Needleman, G.M. Baranzoni, and P. Feng. 2016. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 7. <http://dx.doi.org/doi:10.3389/fmicb.2016.00644>.
- FSA and ACSS, (Food Standards Agency and Advisory Committee for Social Science). 2018. Raw Drinking Milk Consumer Research. Food Standards Agency.
- Fuller, K.L., T.B. Kuhlenschmidt, M.S. Kuhlenschmidt, R. Jiménez-Flores, and S.M. Donovan. 2013. Milk fat globule membrane isolated from buttermilk or whey cream and their lipid components inhibit infectivity of rotavirus in vitro. *J. Dairy Sci.* 96:3488–3497. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6122>.
- Gallier, S., K. Vocking, J.A. Post, B. Van De Heijning, D. Acton, E.M. Van Der Beek, and T. Van Baalen. 2015. A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 136:329–339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.024>.
- Galvez-Behar, G. 2018. Louis Pasteur ou l'entreprise scientifique au temps du capitalisme industriel. *Ann. Hist. Sci. Soc.* 73:627–656. <http://dx.doi.org/10.1017/ahss.2019.46>.
- García-Burgos, M., J. Moreno-Fernández, M.J.M. Alférez, J. Díaz-Castro, and I. López-Aliaga. 2020. New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. *J. Funct. Foods* 72:104059. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2020.104059>.
- Gardette, M., S. Le Hello, P. Mariani-Kurkdjian, L. Fabre, F. Gravey, A. Garrivier, E. Loukiadis, and G. Jubelin. 2019. Identification and prevalence of in vivo-induced genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Virulence* 10:180–193. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2019.1582976>.
- Garred, O., E. Dubinina, A. Poleskaya, S. Olsnes, J. Kozlov, and K. Sandvig. 1997. Role of the disulfide bond in Shiga toxin A-chain for toxin entry into cells. *J. Biol. Chem.* 272:11414–11419. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.17.11414>.
- Gaucheron, F. 2011. Milk and Dairy Products: A Unique Micronutrient Combination. *J. Am. Coll. Nutr.* 30:400S–409S. <http://dx.doi.org/10.1080/07315724.2011.10719983>.
- Geer, S.R., and D.M. Barbano. 2014. The effect of immunoglobulins and somatic cells on the gravity separation of fat, bacteria, and spores in pasteurized whole milk1. *J. Dairy Sci.* 97:2027–2038. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7629>.
- Gehart, H., and H. Clevers. 2019. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16:19–34. <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>.
- Gerlach, R.G., and M. Hensel. 2007. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 297:401–415. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.017>.
- Gomand, F., F. Borges, D. Salim, J. Burgain, J. Guerin, and C. Gaiani. 2018. High-throughput screening approach to evaluate the adhesive properties of bacteria to milk biomolecules. *Food Hydrocoll.* 84:537–544. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.038>.
- Gopal, N., C. Hill, P.R. Ross, T.P. Beresford, M.A. Fenelon, and P.D. Cotter. 2015. The Prevalence and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Front. Microbiol.* 6. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01418>.
- Gopal, P.K., and H.S. Gill. 2000. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Br. J. Nutr.* 84:69–74. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114500002270>.
- Gouali, M., and F.-X. Weill. 2013. Les *Escherichia coli* entérohémostatiques : des entérobactéries d'actualité. *Presse Médicale* 42:68–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2012.10.010>.
- Guerin, J., C. Soligot, J. Burgain, M. Huguet, G. Francius, S. El-Kirat-Chatel, F. Gomand, S. Lebeer, Y. Le Roux, F. Borges, J. Scher, and C. Gaiani. 2018. Adhesive interactions between milk fat globule membrane and *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit bacterial attachment to Caco-2 TC7 intestinal cell. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 167:44–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.044>.
- Guo, M., and G.M. Hendricks. 2008. Chemistry and Biological Properties of Human Milk. *Curr. Nutr. Food Sci.* 4:305–320. <http://dx.doi.org/10.2174/157340108786263667>.
- Gyles, C.L. 1992. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can. J. Microbiol.* 38:734–746. <http://dx.doi.org/10.1139/m92-120>.
- Hansson, G.C., and M.E. Johansson. 2010. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid

- of bacteria. *Gut Microbes* 1:51–54. <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.1.1.10470>.
- Haut Conseil de la santé publique. 2015. Gastroentérites à *Escherichia coli* entérohémorragique. Conduite à tenir. Haut Conseil de la santé publique, Paris, France.
- Henrique, I. de M., F. Sacerdoti, R.L. Ferreira, C. Henrique, M.M. Amaral, R.M.F. Piazza, and D. Luz. 2022. Therapeutic Antibodies Against Shiga Toxins: Trends and Perspectives. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12:825856. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.825856>.
- Henry, M.K., C.M. McCann, R.W. Humphry, M. Morgan, A. Willett, J. Evans, G.J. Gunn, and S.C. Tongue. 2019. The British *E. coli* O157 in cattle study (BECS): factors associated with the occurrence of *E. coli* O157 from contemporaneous cross-sectional surveys. *BMC Vet. Res.* 15:444. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-019-2188-y>.
- Herold, S., J.C. Paton, and A.W. Paton. 2009. Sab, a Novel Autotransporter of Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, Contributes to Adherence and Biofilm Formation. *Infect. Immun.* 77:3234–3243. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00031-09>.
- Herrera-Insua, I., H.F. Gomez, V.A. Diaz-Gonzalez, P. Chaturvedi, D.S. Newburg, and T.G. Cleary. 2001. Human milk lipids bind Shiga toxin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 501:333–339. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-1371-1_41.
- Holt, C. 1992. Structure and Stability of Bovine Casein Micelles. C.B. Anfinsen, F.M. Richards, J.T. Edsall, and D.S. Eisenberg, ed. Academic Press.
- Honish, L., G. Predy, N. Hislop, L. Chui, K. Kowalewska-Grochowska, L. Trottier, C. Kreplin, and I. Zazulak. 2005. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Can. J. Public Health Rev. Can. Sante Publique* 96:182–184. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03403686>.
- Horcajo, P., G. Domínguez-Bernal, R. de la Fuente, J.A. Ruiz-Santa-Quitería, J.E. Blanco, M. Blanco, A. Mora, G. Dahbi, C. López, B. Puentes, M.P. Alonso, J. Blanco, and J.A. Orden. 2012. Comparison of ruminant and human attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains. *Vet. Microbiol.* 155:341–348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.034>.
- Hu, D., and P.R. Reeves. 2020. The Remarkable Dual-Level Diversity of Prokaryotic Flagellins. *mSystems* 5:e00705-19. <http://dx.doi.org/10.1128/mSystems.00705-19>.
- IFOP, (Institut d'études opinion et marketing en France et à l'international). 2021. Webinaire sur la perception des fromages au lait cru par les consommateurs. Accessed September 8, 2022. <https://www.fromagersdefrance.com/actualites/webinaire-sur-la-perception-des-fromages-au-lait-cru-par-les-consommateurs/#:~:text=L%27IFOP%20a%20réalisé%20pour,même%20étude%2C%20réalisée%20en%202018>.
- Imdad, A., S.P. Mackoff, D.M. Urciuoli, T. Syed, E.E. Tanner-Smith, D. Huang, and O.G. Gomez-Duarte. 2021. Interventions for preventing diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *Cochrane Database Rev.* <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD012997.pub2>.
- International Dairy Federation. 2021. IDF Annual Report 2020-2021. International Dairy Federation, Brussel, Belgium.
- Iwamori, M., K. Takamizawa, M. Momoeda, Y. Iwamori, and Y. Taketani. 2008. Gangliosides in human, cow and goat milk, and their abilities as to neutralization of cholera toxin and botulinum type A neurotoxin. *Glycoconj. J.* 25:675–683. <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-008-9128-6>.
- Jauffred, L., R. Munk Vejborg, K.S. Korolev, S. Brown, and L.B. Oddershede. 2017. Chirality in microbial biofilms is mediated by close interactions between the cell surface and the substratum. *ISME J.* 11:1688–1701. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2017.19>.
- Jensen, H., S. Roos, H. Jonsson, I. Rud, S. Grimmer, J.-P. van Pijkeren, R.A. Britton, and L. Axelsson. 2014. Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus in vitro. *Microbiology*, 160:671–681. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.073551-0>.
- Jiménez-Flores, R., and G. Brisson. 2008. The milk fat globule membrane as an ingredient: why, how, when?. *Dairy Sci. Technol.* 88:5–18. <http://dx.doi.org/10.1051/dst:2007005>.
- Jones, G., P. Mariani-Kurkdjian, S. Lefevre, A. Nisavanh, F.-X. Weill, A. Cointe, N.J.-D. Silva, A. Mailles, S. Bonacorsi, and H. de Valk. 2020. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique post-diarrhéique chez l'enfant de moins de 15 ans en France en 2020. *Santé Publique Fr.*
- Jubelin, G., M. Desvaux, S. Schüller, L. Etienne-Mesmin, M. Muniesa, and S. Blanquet-Diot. 2018. Modulation of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Survival and Virulence in the Human Gastrointestinal Tract. *Microorganisms* 6. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms6040115>.
- Juge, N. 2012. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol.* 20:30–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.10.001>.
- Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:123–140. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- Karmali, M.A., B.T. Steele, M. Petric, and C. Lim. 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet Lond. Engl.* 1:619–620. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)91795-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(83)91795-6).
- Katiyar, A. 2022. Calcium's Role in Child Growth and Development and It's Complications. *J. Res. Appl. Sci. Biotechnol.* 1:1–6. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.55544/jrasb.1.1.1>.
- Kavaliauskienė, S., A.B. Dyyve Lingelem, T. Skotland, and K. Sandvig. 2017. Protection against Shiga Toxins. *Toxins* 9:44. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins9020044>.
- Keenan, T.W., and I.H. Mather. 2006. Intracellular Origin of Milk Fat Globules and the Nature of the Milk Fat Globule Membrane. P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. Springer US, Boston, MA.
- Klančnik, A., K. Šimunović, M. Sterniša, D. Ramić, S. Smole Možina, and F. Bucar. 2020. Anti-adhesion activity of phytochemicals to prevent *Campylobacter jejuni* biofilm formation on abiotic surfaces. *Phytochem. Rev.* 55–84. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-020-09669-6>.
- Knutton, S., D.R. Lloyd, and A.S. McNeish. 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* 55:69–77. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.55.1.69-77.1987>.
- Kok, C.R., and R. Hutkins. 2018. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *Nutr. Rev.* 76:4–15. <http://dx.doi.org/10.1093/nutrit/nuy056>.
- Kolling, G.L., and K.R. Matthews. 1999. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1843–1848. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.65.5.1843-1848.1999>.
- Kosmerl, E., D. Rocha-Mendoza, J. Ortega-Anaya, R. Jiménez-Flores, and I. García-Cano. 2021. Improving Human Health with Milk Fat Globule Membrane, Lactic Acid

- Bacteria, and Bifidobacteria 9:341. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9020341>.
- Koutsoumanis, K., A. Allende, A. Alvarez-Ordóñez, S. Bover-Cid, M. Chemaly, R. Davies, A.D. Cesare, L. Herman, F. Hilbert, R. Lindqvist, M. Nauta, L. Peixe, G. Ru, M. Simmons, P. Skandamis, E. Suffredini, C. Jenkins, S.M. Pires, S. Morabito, M. Nauta, T. Niskanen, F. Scheutz, M.T. da S. Felício, W. Messens, and D. Bolton. 2020. Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA J.* 18:e05967. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5967>.
- Kvistgaard, A.S., L.T. Pallesen, C.F. Arias, S. López, T.E. Petersen, C.W. Heegaard, and J.T. Rasmussen. 2004. Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *J. Dairy Sci.* 87:4088–4096. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73551-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73551-1).
- Le Graet, Y., and G. Brulé. 1993. Les équilibres minéraux du lait : influence du pH et de la force ionique. *Le Lait* 73:51–60.
- Le, T.T., T. Van de Wiele, T.N.H. Do, G. Debyser, K. Struijs, B. Devreese, K. Dewettinck, and J. Van Camp. 2012. Stability of milk fat globule membrane proteins toward human enzymatic gastrointestinal digestion. *J. Dairy Sci.* 95:2307–2318. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4947>.
- Leal, J., H.D.C. Smyth, and D. Ghosh. 2017. Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int. J. Pharm.* 532:555–572. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.018>.
- Lee, H., E. Padhi, Y. Hasegawa, J. Larke, M. Parenti, A. Wang, O. Hernell, B. Lönnerdal, and C. Slupsky. 2018. Compositional Dynamics of the Milk Fat Globule and Its Role in Infant Development. *Front. Pediatr.* 6:313. <http://dx.doi.org/10.3389/fped.2018.00313>.
- Lee, K.-S., Y.-J. Jeong, and M.-S. Lee. 2021. *Escherichia coli* Shiga Toxins and Gut Microbiota Interactions. *Toxins* 13. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins13060416>.
- Légifrance. 2007. Décret n°2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères. 2007-628.
- Legros, N., G. Pohlentz, D. Steil, and J. Müthing. 2018. Shiga toxin-glycosphingolipid interaction: Status quo of research with focus on primary human brain and kidney endothelial cells. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 308:1073–1084. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.09.003>.
- Leonard, A.C., L.E. Petrie, and G. Cox. 2019. Bacterial Anti-adhesives: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *ACS Infect. Dis.* 5:1668–1681. <http://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00193>.
- Lindmark Månsson, H. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr. Res.* 52:1821. <http://dx.doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1821>.
- Liu, B., A. Furevi, A.V. Perepelov, X. Guo, H. Cao, Q. Wang, P.R. Reeves, Y.A. Knirel, L. Wang, and G. Widmalm. 2020. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* 44:655–683. <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuz028>.
- Lopez, C. 2005. Focus on the supramolecular structure of milk fat in dairy products. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:497–511. <http://dx.doi.org/10.1051/rnd:2005034>.
- Lopez, C. 2020. *Intracellular Origin of Milk Fat Globules, Composition and Structure of the Milk Fat Globule Membrane Highlighting the Specific Role of Sphingomyelin*. 4th ed. P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, and J.A. O'Mahony, ed. Springer Cham.
- Lopez, C., V. Briard-Bion, O. Menard, F. Rousseau, P. Pradel, and J.-M. Besle. 2008. Phospholipid, Sphingolipid, and Fatty Acid Compositions of the Milk Fat Globule Membrane are Modified by Diet. *J. Agric. Food Chem.* 56:5226–5236. <http://dx.doi.org/10.1021/jf7036104>.
- Lopez, C., C. Cauty, and F. Guyomarc'h. 2015. Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy Sci. Technol.* 95:863–893. <http://dx.doi.org/10.1007/s13594-015-0263-0>.
- Lopez, C., C. Cauty, and F. Guyomarc'h. 2018. Unraveling the Complexity of Milk Fat Globules to Tailor Bioinspired Emulsions Providing Health Benefits: The Key Role Played by the Biological Membrane. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 1800201. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201800201>.
- Lopez, C., and J. Fauquant. 2016. Un nouveau procédé combinant homogénéisation et filtration pour des laits de consommation. Page SPACE 2016 - Conférence internationale.
- Lopez, C., and O. Ménard. 2011. Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 83:29–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.039>.
- Lu, J., N. Argov-Argaman, J. Anggrek, S. Boeren, T. van Hooijdonk, J. Vervoort, and K.A. Hettinga. 2016. The protein and lipid composition of the membrane of milk fat globules depends on their size. *J. Dairy Sci.* 99:4726–4738. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10375>.
- Lu, Y., S. Iyoda, H. Satou, H. Satou, K. Itoh, T. Saitoh, and H. Watanabe. 2006. A New Immunoglobulin-Binding Protein, EibG, Is Responsible for the Chain-Like Adhesion Phenotype of Locus of Enterocyte Effacement-Negative, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 74:5747–5755. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00724-06>.
- Lynch, J.M., D.M. Barbano, M. Schweisthal, and J.R. Fleming. 2006. Precalibration Evaluation Procedures for Mid-Infrared Milk Analyzers1. *J. Dairy Sci.* 89:2761–2774. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72353-0](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72353-0).
- Ma, Y., and D.M. Barbano. 2000. Gravity Separation of Raw Bovine Milk: Fat Globule Size Distribution and Fat Content of Milk Fractions1. *J. Dairy Sci.* 83:1719–1727. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75041-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75041-7).
- Machado, S.G., F. Baglinière, S. Marchand, E. Van Coillie, M.C.D. Vanetti, J. De Block, and M. Heyndrickx. 2017. The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. *Front. Microbiol.* 8:302. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00302>.
- Mariani-Kurkdjian, P., and É. Bingen. 2012. Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. *Réanimation* 21:268–279. <http://dx.doi.org/10.1007/s13546-012-0481-x>.
- Martinez de la Peña, C.F., G.D. Armstrong, M.M.P. Arenas-Hernández, and R.J. Cieza. 2016. Homeostasis vs. Dysbiosis: Role of Commensal *Escherichia coli* in Disease. A.G. Torres, ed. Springer International Publishing, Cham.
- Martins, F.H., A. Rajan, H.E. Carter, H.R. Baniasadi, A.W. Maresso, and V. Sperandio. 2022. Interactions between Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and Gut Commensals at the Interface of Human Colonoids. *mBio* 13:e01321-22. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01321-22>.
- Martín-Sosa, S., M.-J. Martín, and P. Hueso. 2002. The Sialylated Fraction of Milk Oligosaccharides Is Partially Responsible for Binding to Enterotoxigenic and Uropathogenic *Escherichia coli* Human Strains. *J. Nutr.*

- 132:3067–3072.
<http://dx.doi.org/10.1093/jn/131.10.3067>.
- Mazgaeeen, L., and P. Gurung. 2020. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 21:379. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21020379>.
- McCarthy, S.C., C.M. Burgess, S. Fanning, and G. Duffy. 2021. An Overview of Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* Carriage and Prevalence in the Ovine Meat Production Chain. *Foodborne Pathog. Dis.* 18:147–168. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2020.2861>.
- McGuckin, M.A., S.K. Lindén, P. Sutton, and T.H. Florin. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:265–278. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2538>.
- McWilliams, B.D., and A.G. Torres. 2014. EHEC Adhesins. *Microbiol. Spectr.* 2:EHEC-0003-2013. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0003-2013>.
- Melton-Celsa, A., K. Mohawk, L. Teel, and A. O'Brien. 2012. Pathogenesis of Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli*. N. Mantis, ed. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Meynier, A., and C. Genot. 2017. Molecular and structural organization of lipids in foods: their fate during digestion and impact in nutrition. *Oilseeds Fats Crops Lipids* 24:D202. <http://dx.doi.org/10.1051/ocl/2017006>.
- Miszczucha, S.D., J. Thévenot, S. Denis, C. Callon, V. Livrelli, M. Alric, M.-C. Montel, S. Blanquet-Diot, and D. Thevenot-Sergentet. 2014. Survival of *Escherichia coli* O26:H11 exceeds that of *Escherichia coli* O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 172:40–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.029>.
- Montel, M.C., E. Beuvier, and A. Hauwuy. 2003. Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers. *INRAE Prod. Anim.* 16:279–282. <http://dx.doi.org/10.20870/productions-animales.2003.16.4.3667>.
- Montjoux-Régis, N., C. Cristini, C. Arnaud, I. Glorieux, M. Vanpee, and C. Casper. 2011. Improved growth of preterm infants receiving mother's own raw milk compared with pasteurized donor milk. *Acta Paediatr.* 100:1548–1554. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2011.02389.x>.
- Mousavifar, L., and R. Roy. 2019. Alternative therapeutic strategies to fight bacterial infections. *Front. Drug Chem. Clin. Res.* 2. <http://dx.doi.org/10.15761/FDCCR.1000115>.
- Moxley, R.A., D.H. Francis, M. Tamura, D.B. Marx, K. Santiago-Mateo, and M. Zhao. 2017. Efficacy of Urtoxazumab (TMA-15 Humanized Monoclonal Antibody Specific for Shiga Toxin 2) Against Post-Diarrheal Neurological Sequelae Caused by *Escherichia coli* O157:H7 Infection in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Model. *Toxins* 9:49. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins9020049>.
- Mungai, E.A., C. Behraves, and L. Gould. 2015. Increased Outbreaks Associated with Nonpasteurized Milk, United States, 2007–2012. *Emerg. Infect. Dis.* 21:119–122. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2101.140447>.
- Murgiano, L., A.M. Timperio, L. Zolla, S. Bongiorno, A. Valentini, and L. Pariset. 2009. Comparison of Milk Fat Globule Membrane (MFGM) Proteins of Chianina and Holstein Cattle Breed Milk Samples Through Proteomics Methods. *Nutrients* 1:302–315. <http://dx.doi.org/10.3390/nu1020302>.
- Nataro, J.P., and A. Jansen. 2005. Aggregation and Dispersal on Mucosal Surfaces. *Colon. Mucosal Surf.* 253–263. <http://dx.doi.org/10.1128/9781555817619.ch18>.
- Nedeljković, M., D.E. Sastre, and E.J. Sundberg. 2021. Bacterial Flagellar Filament: A Supramolecular Multifunctional Nanostructure. *Int. J. Mol. Sci.* 22:7521. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22147521>.
- Newburg, D.S., J.A. Peterson, G.M. Ruiz-Palacios, D.O. Matson, A.L. Morrow, J. Shults, M. de L. Guerrero, P. Chaturvedi, S.O. Newburg, C.D. Scallan, M.R. Taylor, R.L. Ceriani, and L.K. Pickering. 1998. Role of human-milk lactadherin in protectoin against symptomatic rotavirus infection. *The Lancet* 351:1160–1164. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)10322-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(97)10322-1).
- Newton, H.J., J. Sloan, D.M. Bulach, T. Seemann, C.C. Allison, M. Tauschek, R.M. Robins-Browne, J.C. Paton, T.S. Whittam, A.W. Paton, and E.L. Hartland. 2009. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Negative for Locus of Enterocyte Effacement. *Emerg. Infect. Dis.* 15:372–380. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1502.080631>.
- O'Brien, A.D., and G.D. LaVeck. 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40:675–683. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.40.2.675-683.1983>.
- Ofek, I., D.L. Hasty, and N. Sharon. 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38:181–191. [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00228-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00228-1).
- Ong, L., R.C. Lawrence, J. Gilles, L.K. Creamer, V.L. Crow, H.A. Heap, C.G. Honoré, K.A. Johnston, P.K. Samal, I.B. Powell, and S.L. Gras. 2017. Chapter 33 - Cheddar Cheese and Related Dry-Salted Cheese Varieties. P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, P.D. Cotter, and D.W. Everett, ed. *Academic Press*, San Diego.
- Ort, M., J. Dingemans, J. van den Anker, and P. Kaufmann. 2020. Treatment of Rare Inflammatory Kidney Diseases: Drugs Targeting the Terminal Complement Pathway. *Front. Immunol.* 11:599417. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.599417>.
- Ortega-Anaya, J., A. Marciniak, and R. Jiménez-Flores. 2022. Milk Lipids: Milk Fat Globule Membrane. P.L.H. McSweeney and J.P. McNamara, ed. *Academic Press*, Oxford.
- Orth, D., A.B. Khan, A. Naim, K. Grif, J. Brockmeyer, H. Karch, M. Joannidis, S.J. Clark, A.J. Day, S. Fidanzi, H. Stoiber, M.P. Dierich, L.B. Zimmerhackl, and R. Würzner. 2009. Shiga Toxin Activates Complement and Binds Factor H: Evidence for an Active Role of Complement in Hemolytic Uremic Syndrome. *J. Immunol.* 182:6394–6400. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0900151>.
- Ortiz, Y., E. García-Amézquita, C.H. Acosta, and D.R. Sepúlveda. 2017. *Functional Dairy Products*. G.V. Barbosa-Cánovas, G. María Pastore, K. Candoğan, I.G. Medina Meza, S. Caetano da Silva Lannes, K. Buckle, R.Y. Yada, and A. Rosenthal, ed. *Springer*, New York, NY.
- O'Sullivan, O., and P.D. Cotter. 2017. *Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheeses*. *Academic Press*. P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, P.D. Cotter, and D.W. Everett, ed. *Academic Press*, San Diego.
- Palm, W., and J. Rodenfels. 2020. Understanding the role of lipids and lipoproteins in development. *Development* 147:dev186411. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.186411>.
- Pasteur, L. 1873. *Études Sur Le Vin: Ses Maladies, Causes Qui Les Provoquent, Procédés Nouveaux Pour Le Conserver et Pour Le Vieillir*. Simon Raçon et Comp.
- Paulsson, M., and K. Riesbeck. 2018. How bacteria hack the matrix and dodge the bullets of immunity. *Eur. Respir. Rev.* 27. <http://dx.doi.org/10.1183/16000617.0018-2018>.
- Pedersen, M.G., C. Hansen, E. Riise, S. Persson, and K.E.P. Olsen. 2008. Subtype-Specific Suppression of Shiga Toxin 2 Released from *Escherichia coli* upon Exposure to Protein Synthesis Inhibitors. *J. Clin. Microbiol.*

- 46:2987–2991. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00871-08>.
- Percival, S.L., and D.W. Williams. 2014. Chapter Six - *Escherichia coli*. S.L. Percival, M.V. Yates, D.W. Williams, R.M. Chalmers, and N.F. Gray, ed. Academic Press, London.
- Perrin, F., F. Tenenhaus-Aziza, V. Michel, S. Miszczycha, N. Bel, and M. Sanaa. 2015. Quantitative risk assessment of haemolytic and uremic syndrome linked to O157:H7 and non-O157:H7 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains in raw milk soft cheeses. *Risk Anal. Off. Publ. Soc. Risk Anal.* 35:109–128. <http://dx.doi.org/10.1111/risa.12267>.
- Plateforme de Surveillance de la Chaîne Alimentaire, P. 2022. Surveiller STEC HP en filière de fabrication de fromages au lait cru: Document d'aide méthodologique.
- Quigley, L., O. O'Sullivan, C. Stanton, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, and P.D. Cotter. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37:664–698. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.
- Quintero, M. 2011. Adherence inhibition of *Cronobacter sakazakii* and other pathogens by prebiotic oligosaccharides, plant extracts, and other naturally derived molecules. Diss. Theses Stud. Res. Food Sci. Technol.
- Quintero-Villegas, M.I., B.B. Aam, J. Rupnow, M. Sørli, V.G.H. Eijsink, and R.W. Hutkins. 2013. Adherence Inhibition of Enteropathogenic *Escherichia coli* by Chitooligosaccharides with Specific Degrees of Acetylation and Polymerization. *J. Agric. Food Chem.* 61:2748–2754. <http://dx.doi.org/10.1021/jf400103g>.
- Raikos, V. 2010. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. *Food Hydrocoll.* 24:259–265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.014>.
- Reinhardt, T.A., and J.D. Lippolis. 2006. Bovine Milk Fat Globule Membrane Proteome. *J. Dairy Res.* 73:406–416. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029906001889>.
- Robinson, C.M., J.F. Sinclair, M.J. Smith, and A.D. O'Brien. 2006. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:9667–9672. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602359103>.
- Ross, S. 2016. Targeting the glycome of the milk fat globule membrane for anti-infective properties. Thesis Thesis.
- Roussel, C., C. Cordonnier, W. Galia, O. Le Goff, J. Thévenot, S. Chalancon, M. Alric, D. Thevenot-Sergentet, F. Leriche, T. Van de Wiele, V. Livrelli, and S. Blanquet-Diot. 2016. Increased EHEC survival and virulence gene expression indicate an enhanced pathogenicity upon simulated pediatric gastrointestinal conditions. *Pediatr. Res.* 80:734–743. <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2016.144>.
- Rubin, D., W. Zhang, H. Karch, and T. Kuczius. 2017. Distinct Expression of Immunoglobulin-Binding Proteins in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Implicates High Protein Stability and a Characteristic Phenotype. *Toxins* 9:153. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins9050153>.
- Salamończyk, E. 2013. Cow's milk quality and energy value during different lactation stages. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 12:303–310.
- Sánchez, S., M.T. Llorente, L. Herrera-León, R. Ramiro, S. Nebreda, M.A. Remacha, and S. Herrera-León. 2017. Mucus-Activatable Shiga Toxin Genotype stx2d in *Escherichia coli* O157:H7. *Emerg. Infect. Dis.* 23:1431–1433. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2308.170570>.
- Sánchez-Juanes, F., J.M. Alonso, L. Zancada, and P. Hueso. 2009. Glycosphingolipids from bovine milk and milk fat globule membranes: a comparative study. Adhesion to enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Biol. Chem.* 390:31–40. <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2009.003>.
- Sanchez-Villamil, J.I., D. Tapia, and A.G. Torres. 2019. Development of a Gold Nanoparticle Vaccine against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *mBio* 10:e01869-19. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01869-19>.
- Sarshar, M., P. Behzadi, C. Ambrosi, C. Zagaglia, A.T. Palamara, and D. Scribano. 2020. FimH and Anti-Adhesive Therapeutics: A Disarming Strategy Against Uropathogens. *Antibiotics* 9:397. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics9070397>.
- Schroeder, B.O. 2019. Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterol. Rep.* 7:3–12. <http://dx.doi.org/10.1093/gastro/goy052>.
- Schroten, H., F.G. Hanisch, R. Plogmann, J. Hacker, G. Uhlenbruck, R. Nobis-Bosch, and V. Wahn. 1992. Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. *Infect. Immun.* 60:2893–2899. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.60.7.2893-2899.1992>.
- Schüller, S. 2011. Shiga Toxin Interaction with Human Intestinal Epithelium. *Toxins* 3:626–639. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins3060626>.
- Schüller, S., G. Frankel, and A.D. Phillips. 2004. Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cell. Microbiol.* 6:289–301. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5822.2004.00370.x>.
- Settanni, L., and G. Moschetti. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 27:691–697. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>.
- Sforza, S., V. Cavatorta, F. Lambertini, G. Galaverna, A. Dossena, and R. Marchelli. 2012. Cheese peptidomics: A detailed study on the evolution of the oligopeptide fraction in Parmigiano-Reggiano cheese from curd to 24 months of aging. *J. Dairy Sci.* 95:3514–3526. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-5046>.
- SFP, S.P.F. 2022. Investigation de cas groupés de syndrome hémolytique et urémique (SHU) et d'infections à *E. coli* producteurs de shiga-toxine (STEC) en lien avec la consommation de pizzas Fraîch'Up de marque Buitoni®. Accessed August 10, 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2022/investigation-de-cas-groupes-de-syndrome-hemolytique-et-uremique-shu-et-d-infections-a-e.-coli-producteurs-de-shiga-toxine-stec-en-lien-avec-l>.
- Shoaf-Sweeney, K.D., and R.W. Hutkins. 2008. Chapter 2 Adherence, Anti-Adherence, and Oligosaccharides. Elsevier.
- Sicard, J.-F., G. Le Bihan, P. Vogelee, M. Jacques, and J. Harel. 2017. Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2017.00387>.
- Silva, R.C. da, H.L. Colleran, and S.A. Ibrahim. 2021. Milk fat globule membrane in infant nutrition: a dairy industry perspective. *J. Dairy Res.* 88:105–116. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029921000224>.
- Sinclair, J.F., and A.D. O'Brien. 2002. Cell Surface-localized Nucleolin Is a Eukaryotic Receptor for the Adhesin Intimin- γ of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* 277:2876–2885. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110230200>.
- Sinclair, J.F., and A.D. O'Brien. 2004. Intimin Types α , β , and γ Bind to Nucleolin with Equivalent Affinity but Lower Avidity than to the Translocated Intimin Receptor. *J.*

- Biol. Chem. 279:33751–33758. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M401616200>.
- Singh, H., and S. Gallier. 2017. Nature's complex emulsion: The fat globules of milk. *Food Hydrocoll.* 68:81–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.011>.
- Skeie, S.B., M. Håland, I.M. Thorsen, J. Narvhus, and D. Porcellato. 2019. Bulk tank raw milk microbiota differs within and between farms: A moving goalpost challenging quality control. *J. Dairy Sci.* 102:1959–1971. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-14083>.
- Smith, K.E., P.R. Wilker, P.L. Reiter, E.B. Hedican, J.B. Bender, and C.W. Hedberg. 2012. Antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157 infection and the risk of hemolytic uremic syndrome, Minnesota. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31:37–41. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e31823096a8>.
- Snappe, J.-J., A. Lepoudere, and N. Sredzinski. 2010. Protéines laitières. *Tech. Ing. Addit. Adjuv. Aliment.* 25.
- Soustre, Y., C. Farrock, and R. Jeantet. 2017. Questions Sur Produits Laitiers et Technologie Laitière. Accessed. http://eda.euromilk.org/fileadmin/user_upload/Public_Documents/EDA_Position_papers_-_Fact_Sheets/Other_Fact_Sheets/2017_Technologie_Laitiere_Serie_9.pdf.
- Soysal, N., P. Mariani-Kurkdjian, Y. Smail, S. Liguori, M. Gouali, E. Loukiadis, P. Fach, M. Bruyand, J. Blanco, P. Bidet, and S. Bonacorsi. 2016. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hybrid Pathotype O80:H2 as a New Therapeutic Challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 22:1604–1612. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2209.160304>.
- SPF, (Santé Publique France). 2021. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2020. Accessed August 10, 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-infectieuses-d-origine-alimentaire/toxi-infections-alimentaires-collectives/documents/bulletin-national/surveillance-des-toxi-infections-alimentaires-collectives-donnees-de-la-declaration-obligatoire-2020>.
- SPF, (Santé Publique France). 2022a. Epidémie internationale de salmonellose chez des jeunes enfants en lien avec la consommation de produits de la marque Kinder. Point de situation au 20 avril 2022. Accessed August 10, 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2022/epidemie-internationale-de-salmonellose-chez-des-jeunes-enfants-en-lien-avec-la-consommation-de-produits-de-la-marque-kinder.-point-de-situation-au4>.
- SPF, (Santé Publique France). 2022b. Investigation de cas groupés de syndrome hémolytique et urémique (SHU) et d'infections à *E. coli* producteurs de shiga-toxine (STEC) en lien avec la consommation de pizzas Fraîch'Up de marque Buitoni®. Point de situation au 4 mai 2022. Accessed August 10, 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2022/investigation-de-cas-groupes-de-syndrome-hemolytique-et-uremique-shu-et-d-infections-a-e.-coli-producteurs-de-shiga-toxine-stec-en-lien-avec-la3>.
- Spitsberg, V.L. 2005. Invited Review: Bovine Milk Fat Globule Membrane as a Potential Nutraceutical. *J. Dairy Sci.* 88:2289–2294. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72906-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72906-4).
- Sprong, R.C., M.F.E. Hulstein, T.T. Lambers, and R. van der Meer. 2012. Sweet buttermilk intake reduces colonisation and translocation of *Listeria monocytogenes* in rats by inhibiting mucosal pathogen adherence. *Br. J. Nutr.* 108:2026–2033. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114512000165>.
- Stinson, L.F., J. Ma, A. Rea, M. Dymock, and D.T. Geddes. 2021. Centrifugation does not remove bacteria from the fat fraction of human milk. *Sci. Rep.* 11:572. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-79793-y>.
- Stratakos, A.Ch., M. Linton, P. Ward, M. Campbell, C. Kelly, L. Pinkerton, L. Stef, I. Pet, D. Stef, T. Iancu, K. Theodoridou, O. Gundogdu, and N. Corcionivoschi. 2019. The Antimicrobial Effect of a Commercial Mixture of Natural Antimicrobials Against *Escherichia coli* O157:H7. *Foodborne Pathog. Dis.* 16:119–129. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2018.2465>.
- Syndicat Interprofessionnel du Reblochon, (SIR). 2016. SIR Info. Accessed. https://www.reblochon.fr/wp-content/uploads/2016/07/46-03-16-Pourquoi_lepass_lait_cru.pdf.
- Tai, P., M. Golding, H. Singh, and D. Everett. 2022. The bovine milk fat globule membrane – Liquid ordered domain formation and anticholesteremic effects during digestion. *Food Rev. Int.* 0:1–27. <http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2021.2015773>.
- Tamminen, L.-M., C.R. Hranac, J. Dicksved, E. Eriksson, U. Emanuelson, and L.J. Keeling. 2020. Socially engaged calves are more likely to be colonised by VTEC O157:H7 than individuals showing signs of poor welfare. *Sci. Rep.* 10:6320. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-63186-2>.
- Tamminen, L.-M., R. Söderlund, D.A. Wilkinson, M. Torsein, E. Eriksson, M. Churakov, J. Dicksved, L.J. Keeling, and U. Emanuelson. 2019. Risk factors and dynamics of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 on cattle farms: An observational study combining information from questionnaires, spatial data and molecular analyses. *Prev. Vet. Med.* 170:104726. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104726>.
- Tarr, P.I., C.A. Gordon, and W.L. Chandler. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uremic syndrome. *The Lancet* 365:1073–1086. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71144-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2).
- Tarrah, A., S. Callegaro, S. Pakroo, R. Finocchiaro, A. Giacomini, V. Corich, and M. Cassandro. 2022. New insights into the raw milk microbiota diversity from animals with a different genetic predisposition for feed efficiency and resilience to mastitis. *Sci. Rep.* 12:13498. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-17418-2>.
- Tavaddod, S., and H. Naderi-Manesh. 2017. Evidence of Multi-Domain Morphological Structures in Living *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 7:5660. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-05897-7>.
- Tellez, A., M. Corredig, A. Guri, R. Zanabria, M.W. Griffiths, and V. Delcenserie. 2012. Bovine milk fat globule membrane affects virulence expression in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Dairy Sci.* 95:6313–6319. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5560>.
- Tenaillon, O., D. Skurnik, B. Picard, and E. Denamur. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:207–217. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2298>.
- Thanassi, D.G., S.-P. Nuccio, S. Shu Kin So, and A.J. Bäumlér. 2007. Fimbriae: Classification and Biochemistry. *EcoSal Plus* 2. <http://dx.doi.org/10.1128/ecosalplus.2.4.2.1>.
- The Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment (JEMRA). 2019. Hazard Identification and Characterization: Criteria for Categorizing Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on a Risk Basis. *J. Food Prot.* 82:7–21. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-291>.
- Torres, A.N., N. Chamorro-Veloso, P. Costa, L. Cádiz, F. Del Canto, S.A. Venegas, M. López Nitsche, R.F. Coloma-Rivero, D.A. Montero, and R.M. Vidal. 2020. Deciphering Additional Roles for the EF-Tu, I-Asparaginase II and OmpT Proteins of Shiga Toxin-

- Producing *Escherichia coli*. *Microorganisms* 8:E1184. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8081184>.
- Treacy, J. 2019. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 linked to raw drinking milk resolved by rapid application of advanced pathogen characterization methods. *Eurosurveillance Eur. Commun. Dis. Bull.* 24. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917>.
- Tsutsuki, H., T. Zhang, K. Yahiro, K. Ono, Y. Fujiwara, S. Iyoda, F.-Y. Wei, K. Monde, K. Seto, M. Ohnishi, H. Oshiumi, T. Akaike, and T. Sawa. 2022. Subtilase cytotoxin from Shiga-toxigenic *Escherichia coli* impairs the inflammasome and exacerbates enteropathogenic bacterial infection. *iScience* 25:104050. <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2022.104050>.
- Université de Montpellier. *Histologie Des Organes*. Accessed July 17, 2022. <https://doc-pedagogie.umontpellier.fr/medecine/histologieLV/index.php?module=detail&subaction=desc&vue=4&itm=126&g=1&d=1>.
- Vargas-Bello-Pérez, E., R.I. Márquez-Hernández, and L.E. Hernández-Castellano. 2019. Bioactive peptides from milk: animal determinants and their implications in human health. *J. Dairy Res.* 86:136–144. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029919000384>.
- Verraes, C., G. Vlaemynck, S. Van Weyenberg, L. De Zutter, G. Daube, M. Sindic, M. Uyttendaele, and L. Herman. 2015. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *Int. Dairy J.* 50:32–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.05.011>.
- Wada, A., M. Hasegawa, P.-F. Wong, E. Shirai, N. Shirai, L.-J. Tan, R. Llanes, H. Hojo, E. Yamasaki, A. Ichinose, Y. Ichinose, and M. Senba. 2010. Direct binding of gangliosides to *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) neutralizes its toxin activity. *Glycobiology* 20:668–678. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwq014>.
- Walsh, P.R., and S. Johnson. 2019. Eculizumab in the treatment of Shiga toxin haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 34:1485–1492. <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-018-4025-0>.
- Wang, B.X., C.M. Wu, and K. Ribbeck. 2021. Home, sweet home: how mucus accommodates our microbiota. *FEBS J.* 288:1789–1799. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.15504>.
- WHO. 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007–2015 265.
- WHO. 2020. Sécurité sanitaire des aliments. Accessed September 1, 2019. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.
- Wisener, L.V., J.M. Sargeant, A.M. O'Connor, M.C. Faires, and S.K. Glass-Kaastra. 2015. The Use of Direct-Fed Microbials to Reduce Shedding of *Escherichia coli* O157 in Beef Cattle: A Systematic Review and Meta-analysis. *Zoonoses Public Health* 62:75–89. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12112>.
- Yang, S.-C., C.-H. Lin, I.A. Aljuffali, and J.-Y. Fang. 2017. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch. Microbiol.* 199:811–825. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-017-1393-y>.
- Yao, Y., X. Zhou, H. Hadiatullah, C. Li, X. Wang, and S. Wang. 2021. Effects of Human, Caprine, and Bovine Milk Fat Globules on Microbiota Adhesion and Gut Microecology. *J Agric Food Chem* 10.
- Yu, A.C.Y., L.J. Worrall, and N.C.J. Strynadka. 2012. Structural insight into the bacterial mucinase StcE essential to adhesion and immune evasion during enterohemorrhagic *E. coli* infection. *Struct. Lond. Engl.* 20:707–717. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2012.02.015>.
- Zanabria, R., M.W. Griffiths, and M. Corredig. 2020. Does structure affect biological function? Modifications to the protein and phospholipids fraction of the milk fat globule membrane after extraction affect the antiproliferative activity of colon cancer cells. *J. Food Biochem.* n/a:e13104. <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.13104>.
- Zhang, L., I. García-Cano, and R. Jiménez-Flores. 2020. Characterization of adhesion between *Limosilactobacillus reuteri* and milk phospholipids by density gradient and gene expression. *JDS Commun.* 1:29–35. <http://dx.doi.org/10.3168/jdsc.2020-18939>.
- Zhang, X., M. Payne, S. Kaur, and R. Lan. 2022. Improved Genomic Identification, Clustering, and Serotyping of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Using Cluster/Serotype-Specific Gene Markers. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:772574.
- Zhao, B., and W.A. Houry. 2010. Acid stress response in enteropathogenic gamma-proteobacteria: an aptitude for survival. This paper is one of a selection of papers published in this special issue entitled “Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 52nd Annual Meeting — Protein Folding: Principles and Diseases” and has undergone the Journal’s usual peer review process. *Biochem. Cell Biol.* 88:301–314. <http://dx.doi.org/10.1139/O09-182>.
- Zumbrun, S.D., L. Hanson, J.F. Sinclair, J. Freedy, A.R. Melton-Celsa, J. Rodriguez-Canales, J.C. Hanson, and A.D. O'Brien. 2010. Human intestinal tissue and cultured colonic cells contain globotriaosylceramide synthase mRNA and the alternate Shiga toxin receptor globotetraosylceramide. *Infect. Immun.* 78:4488–4499. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00620-10>.

ANNEXES

Annexe 1 : Matériels supplémentaires relatifs à l'article de recherche n°1

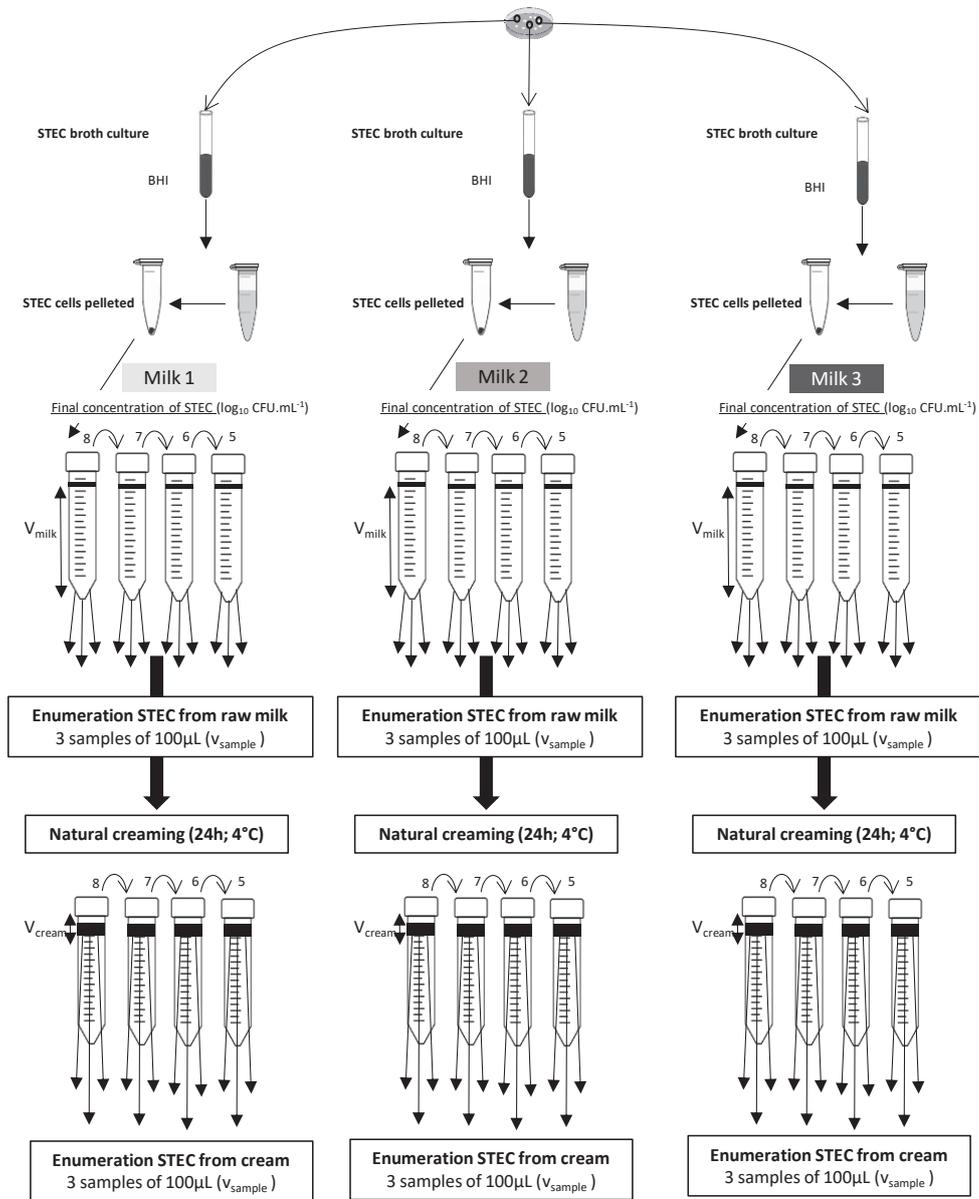


Figure S1. Experimental plan of natural creaming saturation tests.

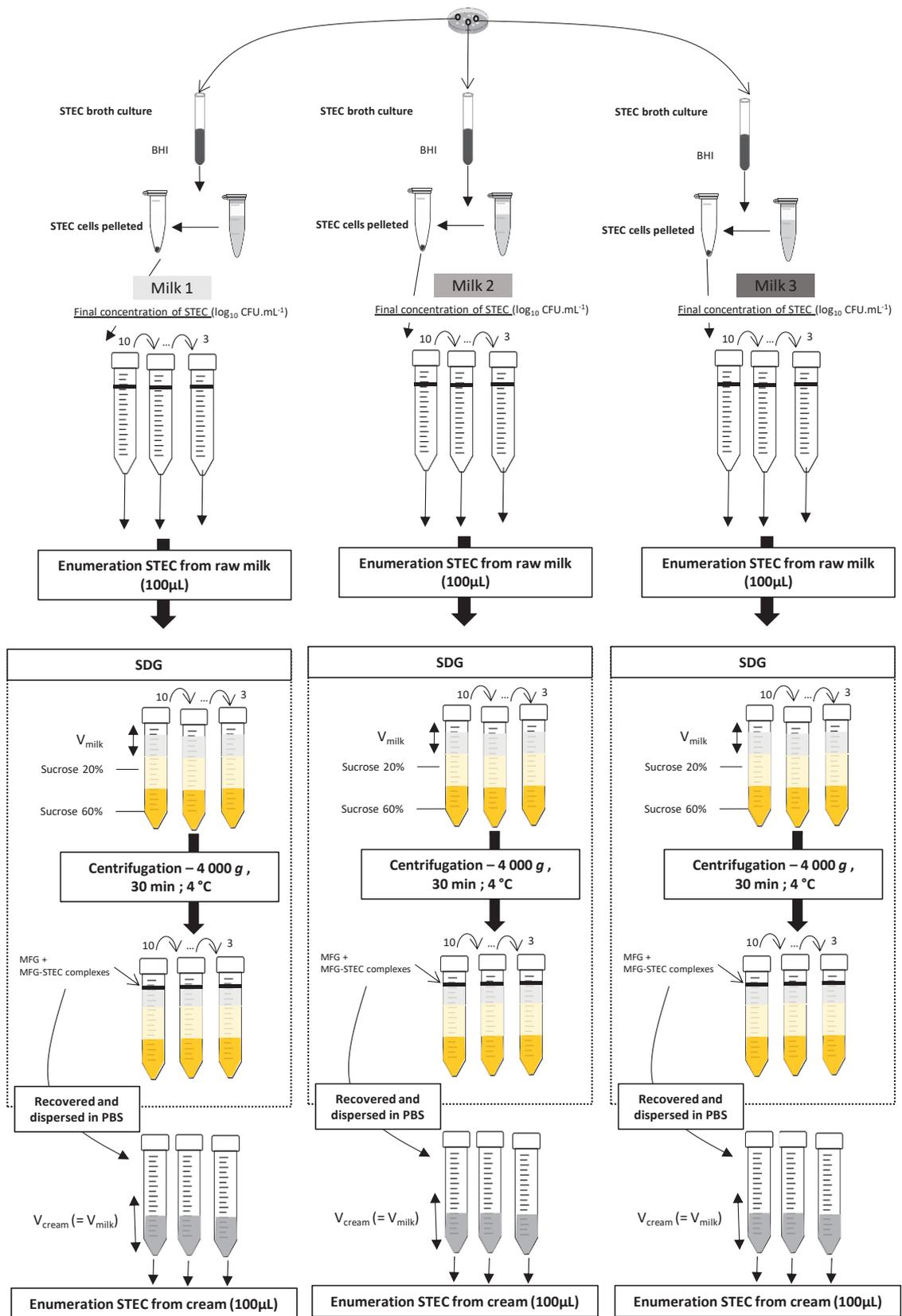


Figure S2. Experimental plan of SDG cream saturation tests.

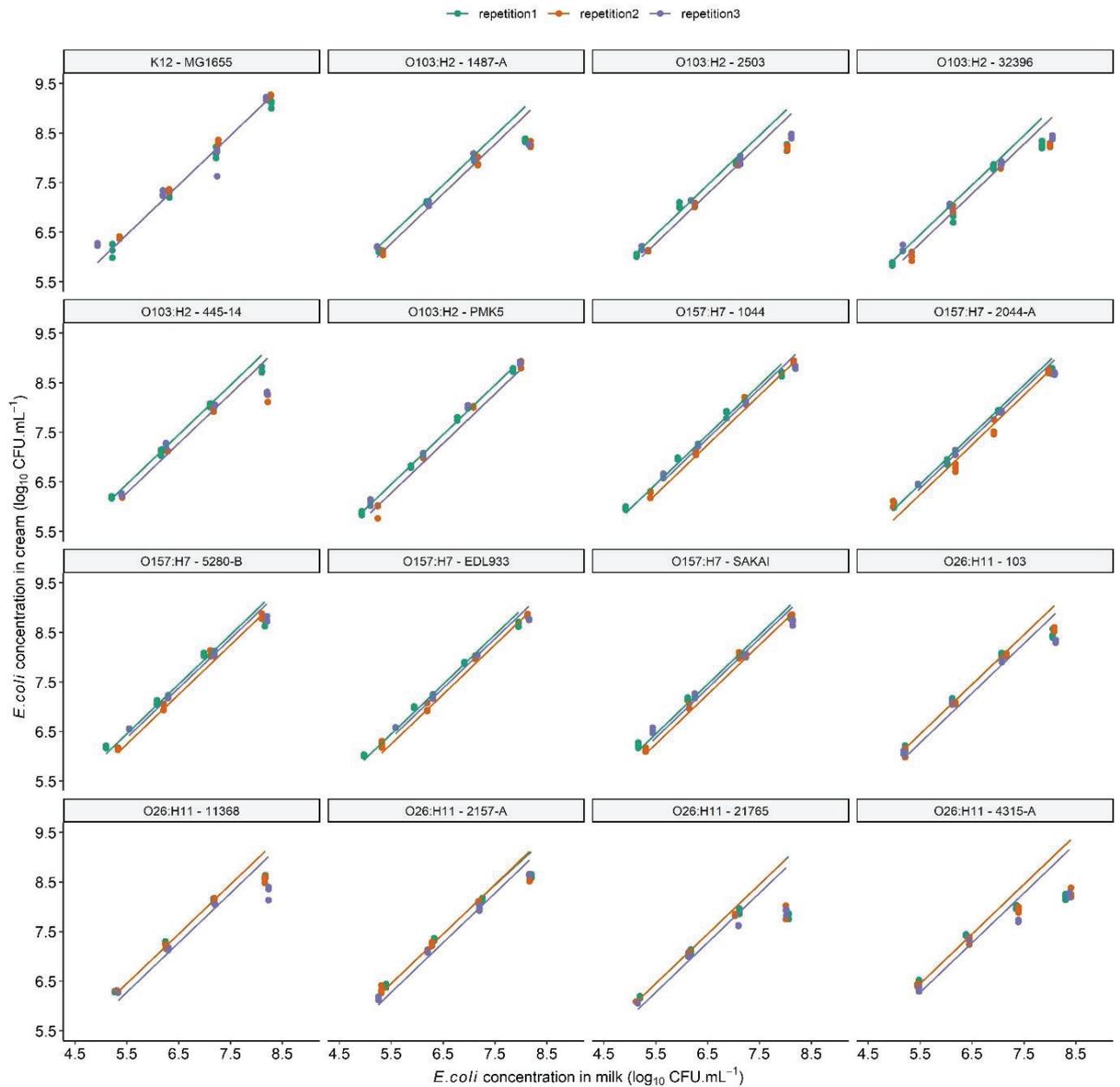


Figure S3. Saturation curves of *E. coli* strains obtained by natural creaming. Aliquots of raw milk were experimentally spiked individually with 16 *E. coli* strains (Table 1) and stocked at 4°C to allow creaming. Several levels of initial *E. coli* concentration in raw milk were evaluated. The concentration of *E. coli* in cream was estimated (n = 3) by plate count after 16h – 24h at 4°C to allow creaming. For each strain, the concentration of *E. coli* in cream versus the initial concentration of *E. coli* in milk was plotted for each replicate (different milk, n = 3). A flat line was plotted for each milk that corresponds to the expected concentration of *E. coli* in the cream if there were no saturation. The concentration of *E. coli* (CFU.mL⁻¹) was expressed in log₁₀ for both phases (raw milk and cream).

Annexe 2 : Matériels supplémentaires relatifs à l'article de recherche n°3

```

OmpA_MG1655 MKKTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNWTYTGAKLGWSQYHDTGFINNNGPTHEINQLGAGAFGGYQVNPYVGFEMGYDWLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQL 100
OmpA_PMK5 MKKTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNWTYTGAKLGWSQYHDTGFINNNGPTHEINQLGAGAFGGYQVNPYVGFEMGYDWLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQL 100
OmpA_EDL933 MKKTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNWTYTGAKLGWSQYHDTGFINNNGPTHEINQLGAGAFGGYQVNPYVGFEMGYDWLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQL 100
OmpA_21765 MKKTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNWTYTGAKLGWSQYHDTGFINNNGPTHEINQLGAGAFGGYQVNPYVGFEMGYDWLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQL 100

OmpA_MG1655 TAKLGYPIITDDLDIYTRLGGMVWRADTKSNVYGNHDTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQWTNNIGDAHTIGTRPDNGMLSLGVSYRFGQGEAAPVV 200
OmpA_PMK5 TAKLGYPIITDDLDIYTRLGGMVWRADTKSNVYGNHDTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQWTNNIGDAHTIGTRPDNGMLSLGVSYRFGQGEAAPVV 200
OmpA_EDL933 TAKLGYPIITDDLDIYTRLGGMVWRADTKSNVYGNHDTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQWTNNIGDAHTIGTRPDNGMLSLGVSYRFGQGEAAPVV 200
OmpA_21765 TAKLGYPIITDDLDIYTRLGGMVWRADTKSNVYGNHDTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQWTNNIGDAHTIGTRPDNGMLSLGVSYRFGQGEAAPVV 200

OmpA_MG1655 APAPAPAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQAALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIGSDAYNQGLSERRAQSVDYLSKGI PADKISARGM 300
OmpA_PMK5 APAPAPAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQAALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIGSDAYNQGLSERRAQSVDYLSKGI PADKISARGM 300
OmpA_EDL933 APAPAPAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQAALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIGSDAYNQGLSERRAQSVDYLSKGI PADKISARGM 300
OmpA_21765 APAPAPAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQAALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIGSDAYNQGLSERRAQSVDYLSKGI PADKISARGM 300

OmpA_MG1655 GESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKGIKDVVTQPQA 346
OmpA_PMK5 GESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKGIKDVVTQPQA 346
OmpA_EDL933 GESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKGIKDVVTQPQA 346
OmpA_21765 GESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKGIKDVVTQPQA 346

```

Figure S1. Alignment of the OmpA sequences of the three STEC strains studied (O157:H7 EDL933, O103:H3 PMK5, and O26:H11 21765) and the non-pathogenic *E. coli* strain MG1655 K-12. An E → K mutation at residue 89 H11 was identified for O26:H11 str. 21765.

Table S1. Primers and PCR conditions used for bacterial mutant construction

Oligo name	Oligo sequence (5' to 3')	Information	Thermocycler program
Overlapping DNA amplicons for homologous recombination			
FadLtoKan.F	TCCTGTTACAGCACGTAACATAGTTTGATATAAAAAATAATCA TTGAGGTTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Hybrid primers for overlapping DNA amplicon with 20 nucleotides of pKD4 priming sites and with 50 nucleotides from each side of <i>fadL</i> .	<p>Initialization : 98°C - 30 s 35 cycles :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Denaturation : 98°C - 10 s - Annealing : 56°C - 30 s - Extension/elongation : 72 °C - 120 s <p>Final hold : 4°C - +Inf</p>
FadLtoKan.R	GAGTTAAAGTCACTCCCTGATGCAGGTGACTTTATCCAGGC GAACCGTTAATGGGAATTAGCCATGGTCC		
OmpNtoKan.F	TCCCGAAATGGGATAAAAGGCAAAATAAAATAACTAAAG GATTTATTCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Hybrid primers for overlapping DNA amplicon with 20 nucleotides of pKD4 priming sites and with 50 nucleotides from each side of <i>ompN</i> .	
OmpNtoKan.R	AGGAGGAATAAGCAGCAAAAAAGCCCGCCATAACAGCG GGCAGGAGGATATGGGAATTAGCCATGGTCC	Hybrid primers for overlapping DNA amplicon with 20 nucleotides of pKD4 priming sites and with 50 nucleotides from each side of <i>ompA</i> .	
OmpAtoKan.F	AAAGGCAAAAAAACCCTCCGACGAGCGGGTTTTTCTACC AGACGAGAACGTTAGGCTGGAGCTGCTTC	Hybrid primers for overlapping DNA amplicon with 20 nucleotides of pKD4 priming sites and with 50 or 58 nucleotides (optimization of annealing site between both strains) from each side of <i>fliC</i> of the strains O26:H11 21765 and O103:H2 PMK5	
OmpAtoKan.R	CTCGTTGGAGATAATTCATGGCGTATTTTGGATGATAACGAG CGCCAAAAATGGGAATTAGCCATGGTCC	Hybrid primers for overlapping DNA amplicon with 20 nucleotides of pKD4 priming sites and with 50 or 58 nucleotides (optimization of annealing site between both strains) from each side of <i>fliC</i> of the strains O26:H11 21765 and O103:H2 PMK5	
FliCtoKan1.F	GGTAAATGGCGGACGAAAAAACCCTCCGCGGTGGCGGGG GTTGAGCGATAAGTGTAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Hybrid primers for overlapping DNA amplicon with 20 nucleotides of pKD4 priming sites and with 50 nucleotides from each side of <i>fliC</i> of the strains O157:H7 EDL933	
FliCtoKan1.R	CGTGGCAACACAGCCCAATAACATCAAGTTGTAAATTGATAAG GAAAAGATCATGGGAATTAGCCATGGTCC		
FliCtoKan2.F	ATCAGGCAATTTGGCGTTGCCGTCAGTCTCAGTTAATCAG GTTACAACGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC		
FliCtoKan2.R	GGTGGAAACCCCAATACGTAATCAACGACTTGCAATATAGG ATAACGAAATCATGGGAATTAGCCATGGTCC		
Verification of gene deletion in mutants			
Kan.R	GCCCAGTCATAGCCCGAATAG	Primers targeting the Kan resistant cassette. These primers were used in combination with the primers targeting the upstream or downstream regions of disrupted bacterial genes to confirm the KO	<p>Initialization : 94°C - 2 min 25 cycles :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Denaturation : 94°C - 30 s - Annealing : 56.5°C - 30 s - Extension/elongation : 72 °C - 180 s <p>Final hold : 4°C - +Inf</p>
Kan.F	CGTTGGCTACCCGTGATATT	Primers targeting the downstream or upstream region of <i>ompN</i> . These primers were used with KanF or KanR primers, respectively, to confirm the replacement of <i>ompN</i> by the Kan cassette.	
FadL.down.R	CTGGGTAAGTTGGCTGGTA	Primers targeting the downstream or upstream region of <i>fadL</i> . These primers were used with KanF or KanR primers, respectively, to confirm the replacement of <i>fadL</i> by the Kan cassette.	
FadL.up.F	AGCGTTTGTCTGCTTCTGC	Primers targeting the downstream or upstream region of <i>ompN</i> . These primers were used with KanF or KanR primers, respectively, to confirm the replacement of <i>ompN</i> by the Kan cassette.	
OmpN.down.R	CTCTGCCCTCAACGTGGCTAA	Primers targeting the downstream or upstream region of <i>ompA</i> . These primers were used with KanF or KanR primers, respectively, to confirm the replacement of <i>ompA</i> by the Kan cassette.	
OmpN.up.F	AGAAACGTTACTTACACGAGCA	Primers targeting the downstream or upstream region of <i>fliC</i> for the strains O26:H11 21765 and O103:H2 PMK5. These primers were used with KanF or KanR primers, respectively, to confirm the replacement of <i>fliC</i> by the Kan cassette.	
OmpA.down.R	CAGGCATTGCTGGGTAAGGA	Primers targeting the downstream or upstream region of <i>fliC</i> for the strains O26:H11 21765 and O103:H2 PMK5. These primers were used with KanF or KanR primers, respectively, to confirm the replacement of <i>fliC</i> by the Kan cassette.	
OmpA.up.F	ACTTTACATCGCCAGGGGTG	Primers targeting the downstream or upstream region of <i>fliC</i> for the strains O26:H11 21765 and O103:H2 PMK5. These primers were used with KanF or KanR primers, respectively, to confirm the replacement of <i>fliC</i> by the Kan cassette.	
FliC.down1.R	ACCTGCTCGGTGGAAACTT	Primers targeting the downstream or upstream region of <i>fliC</i> for the strains O26:H11 21765 and O103:H2 PMK5. These primers were used with KanF or KanR primers, respectively, to confirm the replacement of <i>fliC</i> by the Kan cassette.	
FliC.up1.F	TTCATCCAGCATAGCGCCAC	Primers targeting the downstream or upstream region of <i>fliC</i> for the strains O157:H7 EDL933. Amorces were used with KanF or KanR primers, respectively, to confirm the replacement of <i>fliC</i> by the Kan cassette.	
FliC.down2.R	GGGTGACGCTGATGGTGTAT		
FliC.up2.F	TCATAGCGTTCGACGGCATT		