



HAL
open science

Microbiote mammaire bovin : état des lieux bibliographique

Charlotte Legru

► **To cite this version:**

Charlotte Legru. Microbiote mammaire bovin : état des lieux bibliographique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. dumas-04646129

HAL Id: dumas-04646129

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04646129v1>

Submitted on 12 Jul 2024

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.

ANNEE 2024 - Thèse n° 8

**Microbiote mammaire bovin :
Etat des lieux bibliographique**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

Le 6 mai 2024

par

Charlotte LEGRU

Sous la direction de

Professeur Jean-François BRUYAS

Président du jury : Madame Nathalie BAREILLE Professeur à ONIRIS

Membres du jury : Monsieur Jean-François BRUYAS Professeur à ONIRIS, Rapporteur

Monsieur Jean-Michel CAPPELIER Professeur à ONIRIS, Assesseur

ANNEE 2024 - Thèse n° 8

**Microbiote mammaire bovin :
Etat des lieux bibliographique**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

Le 6 mai 2024

par

Charlotte LEGRU

Sous la direction de

Professeur Jean-François BRUYAS

Président du jury : Madame Nathalie BAREILLE Professeur à ONIRIS

Membres du jury : Monsieur Jean-François BRUYAS Professeur à ONIRIS, Rapporteur

Monsieur Jean-Michel CAPPELIER Professeur à ONIRIS, Assesseur

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment		
Responsable : Emmanuel JAFFRES – Adjointe : Frédérique NGUYEN		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Martine KAMMERER (PR émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC)	Solenn GAVAUD (CERC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Pierre CORDIER (CERC) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC HDR) Emmanuel JAFFRES (MC HDR)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Quentin PRUVOST (CEC)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	Charlotte MOCQUARD (PRAG) Aurore CALVEL (PRAG)
Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique		
Responsable : Raphaël GUATTEO – Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER		
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ (Pr) Aurélien MADOUASSE (MC HDR) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) François MEURENS (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr) Pauline MAISONNASSE (CERC)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr émérite) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Sofia STRUBBIA (MC) Fanny RENOIS-MEURENS (MC HDR)

Département DSC Sciences cliniques		
Responsable : Catherine IBISCH – Adjoint : Marion FUSELLIER		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (Pr)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC) Claire DEFOURMESTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	Sabrina VIEU (AERC) Maria Dolores SANCHEZ (CERC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (Pr) Catherine IBISCH (MC HDR) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND (Pr)
Département GPA Génie des procédés alimentaires		
Responsable : Vanessa JURY – Adjointe : Cyril TOUBLANC		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (Pr) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril Gaillard (PCEA)	
Département MSC Management, statistiques et communication		
Responsable : Samira ROUSSELIERE – Adjointe : Véronique CARIOU		
Mathématiques, statistiques, informatique	Chantal THORIN (PRAG) Evelyne VIGNEAU (Pr) Jean-Michel GALHARRET (MC stagiaire)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC) Sibylle DUCHAINE (MC)	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel,
 PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole,
 HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens.
 Cont. : Enseignant Contractuel

REMERCIEMENTS

A Madame Nathalie Bareille,
Professeur à Oniris
Pour nous avoir fait l'honneur de Présider notre jury de thèse ;
Remerciements et hommages respectueux.

A Monsieur Jean-François Bruyas,
Professeur à Oniris
Pour m'avoir accompagné sur mon sujet ainsi que sur sa rédaction,
Sincères remerciements.

A Monsieur Jean-Michel Cappelier ;
Professeur à Oniris
Pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse,
Sincères remerciements.

Table des matières

REMERCIEMENTS	7
Introduction.....	17
Avant-propos : Généralités sur le microbiote et son fonctionnement	19
I- Qu'est-ce qu'un microbiote ?.....	19
II- Rappels sur la physiologie de la mamelle.....	19
Partie I- Le microbiote mammaire bovin : découverte et caractérisation	22
I- Découverte du microbiote mammaire : les méthodes utilisées	22
1.1 PCR et séquençage de l'ARNr 16S : la technique méta-génétique la plus utilisée.....	22
1.1.1 Extraction d'ADN	22
1.1.2 Amplification par PCR :.....	22
1.1.3 Séquençage.....	24
1.2 Métagénomique	25
1.3 Protéomique.....	25
II- Biais et erreurs des techniques utilisées	25
2.1 Biais biologiques :	26
2.2 Biais et erreurs d'échantillonnage.....	26
2.3 Biais techniques	27
Partie II- Résultats des études récentes	33
I- La composition du microbiote est complexe	33
II- Facteurs de variabilité	34
III- Avec une capacité de résilience.....	37
Partie III - Cohérence avec la physiologie de la mamelle	39
I- Postulats sur la colonisation mammaire	39
1.1 L'axe entéro-mammaire.	39
1.2 Colonisation par exposition externe.....	41
II- Epithélium mammaire non muqueux.....	43
III- Prophylaxie actuelle : repose sur une idée « stérile » de la mamelle	43
Partie IV- conséquences et perspectives.....	45
I- Conséquences sur les connaissances de la pathogénie des mammites.....	45
II- Conséquences des traitements antibiotiques sur le microbiote mammaire	46
III- Perspectives futures : nouvelles mesures de prophylaxie ?.....	46
CONCLUSION	49
ANNEXES.....	51
BIBLIOGRAPHIE.....	53

Liste des annexes

Annexe 1 : tableau de données de matériel et méthodes utilisées les différents articles sur l'identification du microbiote mammaire bovin sélectionnés pour les statistiques	51
--	----

Liste des figures

Figure 1 : structure alvéolaire de la mamelle	20
Figure 2 : différentes approches de l'étude d'un microbiote.....	22
Figure 3 : différentes régions d'ADN codant pour l'ARN 16S	23
Figure 4 : principe de la PCR	23
Figure 5 : principe du séquençage par la méthode Sanger	24
Figure 6 : taux d'utilisation des Kits d'extractions utilisés dans les études sur le microbiote mammaire bovin	28
Figure 7 : taux d'utilisation des amorces de la séquence 16S utilisées dans 30 études sur le microbiote mammaire bovin	29
Figure 8 : taux d'utilisation des différentes technologies de séquençage dans l'ensemble des études analysées sur le microbiote mammaire bovin	31
Figure 9 : comparaison entre les principaux taxons du microbiote mammaire chez la femme et les bovins	34
Figure 10 : fonctionnement de l'axe entéro-mammaire	40
Figure 11 : interaction du microbiote mammaire avec le microbiote salivaire du nourrisson (d'après Rodrigez, 2014).....	42

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

ddNTP : didésoxyribonucléotide

ddATP : désoxyadénosine triphosphate

ddCTP : désoxycytidine triphosphate

ddGTP : désoxyguanosine triphosphate

ddTTP : désoxythymidine triphosphate

dNTP : désoxyribonucléotide

GALT : tissu lymphoïde associé au tube digestif

GIT : microbiote gastro-intestinal

NGS : séquençage de nouvelle génération

OTU : unité taxonomique opérationnelle

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

RER : réticulum endoplasmique rugueux

VCF : Variant Calling Files

INTRODUCTION

Actuellement, de nombreuses connaissances sont disponibles sur les interactions entre les hôtes et le microbiote associé sur les épithéliums muqueux ou cutanés. En effet, le corps héberge de nombreuses communautés microbiennes complexes dont la composition est déterminée par l'habitat et les variations individuelles. Il est maintenant largement admis qu'une relation harmonieuse entre l'hôte et son microbiote contribue à une bonne santé car celui-ci joue un rôle fondamental dans l'induction, la formation et le fonctionnement du système immunitaire de l'hôte.

La plupart des études ont traité le microbiote cutané ou gastro-intestinal, mais récemment d'autres sites corporels ont été étudiés telles que les voies oropharyngées, urinaires, génitales et pulmonaire. Récemment, la glande mammaire bovine a également été étudiée et la présence d'un microbiote mammaire fait débat. En effet, bien que la glande mammaire soit jusque-là considérée comme un organe stérile, l'apparition des méthodes moléculaires tel que le séquençage de l'ADN (acide désoxyribonucléique) bactérien suggère l'existence de communautés microbiennes dans celle-ci. Ces découvertes remettent alors en question la prophylaxie habituelle contre les mammites bactériennes.

L'objectif de cette thèse est donc de faire l'état des lieux de la littérature sur la présence d'un tel microbiote, de le caractériser et d'en envisager les conséquences sur les moyens de lutte actuels contre les mammites bactériennes.

Avant-propos : Généralités sur le microbiote et son fonctionnement

I- Qu'est-ce qu'un microbiote ?

Le microbiote est constitué de multiples microorganismes qui colonisent un organisme complexe, et maintiennent des liens étroits avec leur hôte.

Chez les bovins, les microbiotes sont hébergés dans de nombreux habitats : la peau, l'espace interdigité, le tractus digestif, respiratoire, génital et bien d'autres encore. Ils sont d'une grande importance pour la physiologie et la santé de l'animal (Alipour *et al.*, 2018; Nicola *et al.*, 2017). Le microbiote ruminal en particulier joue un rôle essentiel dans la santé de son hôte, en jouant un rôle dans la nutrition, par la valorisation des glucides pariétaux, il synthétise des acides aminés essentiels et des vitamines (Zened *et al.*, 2021).

Si on prend l'exemple du microbiote intestinal humain, tout en se nourrissant des nutriments du contenu intestinal, il participe à l'immunité de l'hôte. En effet, il fait barrière aux agents pathogènes par une compétition métabolique, une occupation des sites d'adhésion, une modification de la sécrétion du mucus et une protection cellulaire (lymphocytes intraépithéliaux) et humorale (immunoglobulines A) (Grunberg *et al.*, 2015). Il a également un rôle dans la motricité intestinale, participe à la digestion en influençant l'absorption et la distribution des nutriments (Bäckhed *et al.*, 2004; Cebra, 1999).

II- Rappels sur la physiologie de la mamelle

Afin de comprendre l'intégration du microbiote mammaire bovin au fonctionnement de la mamelle, il apparaît nécessaire de rappeler le mécanisme de production du lait.

Le lait est synthétisé dans des cellules sécrétoires épithéliales spécialisées à partir de substances absorbées par le sang. L'unité sécrétoire de base est l'alvéole, structure constituée d'un groupe de cellules sécrétoires entourant une cavité centrale ou lumen (Figure 1). La lumière est reliée par une série de conduits étroits jusqu'à la citerne ou au sinus lactifère où le lait est libéré via le trayon. Chaque alvéole est entourée de cellules contractiles spécialisées, le myoépithélium. Ces cellules se contractent sous l'influence de l'ocytocine produite dans l'hypophyse postérieure, expulsant le lait de l'alvéole. Les groupes d'alvéoles, appelés lobules, sont séparés les uns des autres par le tissu conjonctif (Sérieys, 1997).

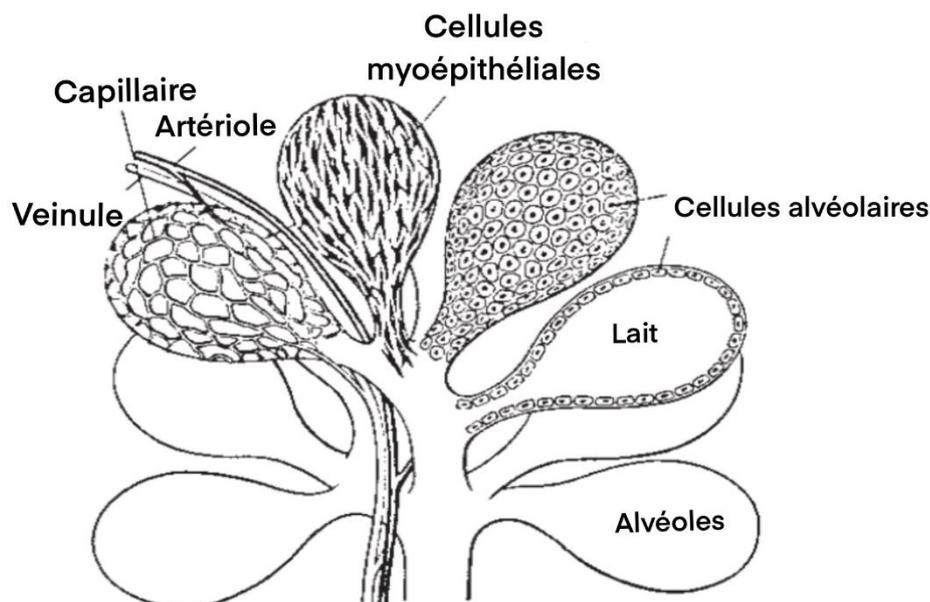


Figure 1 : structure alvéolaire de la mamelle (d'après Sérieyes, 1997)

Les cellules alvéolaires sont polarisées : la production des constituants du lait se fait à partir de la base de la cellule (si provenance sanguine) ou du noyau (si synthèse assurée par la cellule mammaire) vers l'apex (lumière, siège de concentration de la synthèse lactée). Elles ont une activité synthétique intense ce qui explique l'abondance des mitochondries, du réticulum endoplasmique rugueux (RER) et des ribosomes. En moyenne, la glande mammaire produit 50 à 100 mL de lait par kg de poids vif et par jour. La synthèse de lait repose sur l'organisation des lipides en globules gras puis leur exocytose. Le processus est similaire pour le lactose et pour les protéines synthétisées dans le RER puis maturées dans l'appareil de Golgi. La sécrétion lactée met donc en jeu d'important échanges membranaires à l'origine d'un renouvellement complet de la membrane des villosités toutes les 20 minutes.

A la naissance, il y a peu de développement du tissu mammaire, avec seulement la présence de mamelons, du tissu conjonctif et quelques canaux courts. Il y a une absence d'alvéoles et l'espace est occupé par les cellules graisseuses. Bien que la différenciation supplémentaire survienne à la puberté chez de nombreuses espèces, chez le bovin ce n'est que pendant la gestation que le développement du conduit et des systèmes lobulo-alvéolaires commencent.

Pour ce qui est du système immunitaire, il est généralement admis que les macrophages sont le type de cellule prédominant dans le lait bovin provenant de glandes saines (Dosogne *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 1991). Des lymphocytes et des neutrophiles sont également présents avec un faible pourcentage de cellules épithéliales détachées qui constituent ensemble la population totale de cellules somatiques. Pendant l'inflammation, les neutrophiles sont rapidement recrutés dans la glande mammaire, devenant le type de cellule prédominant et augmentant le nombre de cellules somatiques dans les quartiers inflammés (Riollet *et al.*, 2000). Les macrophages dans le lait sont dérivés de monocytes sanguins qui sortent de la circulation sanguine, migrent à travers l'épithélium et pénètrent dans la glande mammaire (Goldman & Goldblum, 1997). Les macrophages jouent un rôle clé dans la surveillance immunitaire, agissant en tant que cellules piègeuses avec la capacité de

reconnaître les agents pathogènes et d'initier des réponses innées par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. À la suite de la phagocytose des antigènes, certains macrophages tissulaires se différencient en cellules dendritiques et migrent vers les ganglions lymphatiques drainants où ils interagissent avec les lymphocytes T pour induire des réponses acquises spécifiques de l'antigène. Les macrophages peuvent également fonctionner comme des cellules présentatrices d'antigène, dont un sous-ensemble est capable d'induire une tolérance par interaction avec les cellules dendritiques CD103 + (Mazzini *et al.*, 2014). Les macrophages du lait maternel expriment certains marqueurs de surface des cellules dendritiques, produisent spontanément un facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages et ont la capacité unique de se différencier en cellules dendritiques lorsqu'ils sont stimulés par l'interleukine-4. Combinés, ces résultats suggèrent que les macrophages du lait maternel présentent des caractéristiques compatibles avec celles des cellules dendritiques partiellement différenciées, et que ces cellules peuvent jouer un rôle dans la médiation des réponses immunitaires dépendantes des lymphocytes T dans la glande mammaire.

La recirculation des lymphocytes entre des sites muqueux distants via les systèmes sanguin et lymphatique a été étudiée chez plusieurs espèces. Chez les humains et les rongeurs, les cellules lymphoïdes du tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT) couvrent la glande mammaire, formant un lien entéro-mammaire et contribuant à ce qu'on appelle "système muqueux commun" dans lequel des sites muqueux distants sont liés via la migration des cellules immunitaires (Weisz-Carrington *et al.*, 1979). Contrairement à ces résultats, des études chez les ruminants ont démontré que la migration des cellules lymphoïdes entre l'intestin et la glande mammaire est limitée, ce qui suggère que le lien entéro-mammaire est moins fonctionnel chez les ruminants (Harp *et al.*, 1988). Récemment, une hypothèse a été émise : bien que les phagocytes mononucléaires trouvés dans le lait maternel soient en grande partie dérivés des monocytes du sang périphérique, une proportion de ces phagocytes mononucléaires sont des cellules analogues à des cellules dendritiques qui apparaissent dans le GALT et capturent le microbiote luminal puis transportent ces composants microbiens vers la glande mammaire. On pense qu'un tel mécanisme existe pour éduquer le système immunitaire néonatal à reconnaître des modèles moléculaires communs associés aux bactéries et à y répondre de manière appropriée (Donnet-Hughes *et al.*, 2010). À la connaissance des auteurs, le rôle des cellules dendritiques dans le transport des composants bactériens de l'intestin vers la glande mammaire chez les ruminants reste relativement inconnu.

Partie I- Le microbiote mammaire bovin : découverte et caractérisation

I- Découverte du microbiote mammaire : les méthodes utilisées

1.1 PCR et séquençage de l'ADNr 16S : la technique méta-génétique la plus utilisée

La majorité des études utilisent une méthode métagénétique, qui consiste à l'étude du contenu génétique des échantillons (Figure 2). Ces études réalisent une extraction d'ADN, puis une PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en temps réel (en général 40 à 50 cycles) et enfin un séquençage des variants amplifiés, ce qui constitue une méthode sensible, relativement peu coûteuse et rapide permettant d'identifier les bactéries à partir d'une seule région génomique (Oikonomou *et al.*, 2020 ; Sanschagrín & Yergeau, 2014 ; Schloss *et al.*, 2011).

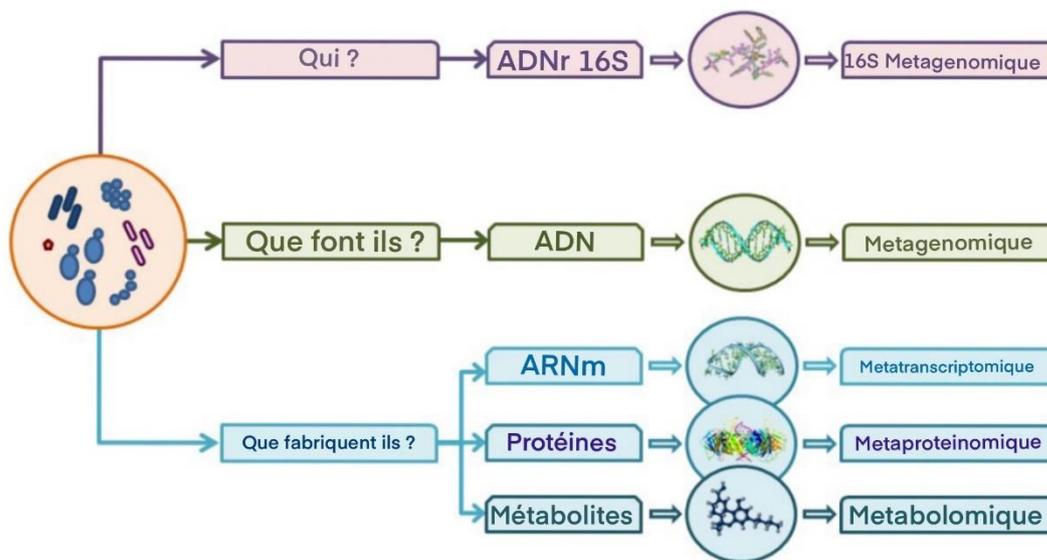


Figure 2 : différentes approches de l'étude d'un microbiote (d'après Addis *et al.*, 2016)

1.1.1 Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN de l'échantillon est une étape indispensable avant de traiter les informations contenues par le matériel génétique. Il existe de nombreuses techniques d'extraction, des techniques différentes et des types d'échantillons de lait différents ont été utilisés pour les études sur le microbiote mammaire, cependant elles s'appuient toutes sur des méthodes similaires. La première étape consiste en une lyse cellulaire de l'échantillon laitier utilisant des méthodes mécaniques, un traitement chimique (détergents) et une digestion enzymatique afin de dénaturer les protéines et les couches lipidiques. Afin d'extraire l'ADN et de le purifier des méthodes chimiques telles que l'extraction/précipitation, la chromatographie, la séparation par affinité et la centrifugation sont utilisées (Glassing *et al.*, 2016 ; Knudsen *et al.*, 2016 ; Somma, 2003).

1.1.2 Amplification par PCR :

Après une extraction de l'ADN présent dans l'échantillon de lait prélevé, la PCR est une étape permettant l'amplification de certains gènes ciblés, avant de réaliser un séquençage. Les études menées utilisent des régions spécifiques de gènes codants pour l'ARNr (acide ribonucléique ribosomal) 16S comme cible pour réaliser le séquençage (Figure 3)(Oikonomou *et al.*, 2020). Ces gènes sont présents dans toutes les cellules procaryotes, ont un taux très faible de transfert horizontal (transmission de matériel génétique d'un individu à un autre) et présentent un matériel

généétique suffisamment important pour différencier les organismes étroitement apparentés (Case *et al.*, 2007; Woese et Fox, 1977). Ces gènes présentent de nombreuses régions variables qui n'ont pas de rôle fonctionnel et permettent de distinguer différents taxons ainsi que des régions constantes communes alors utilisées comme amorce pour les PCR (Schloss *et al.*, 2011).

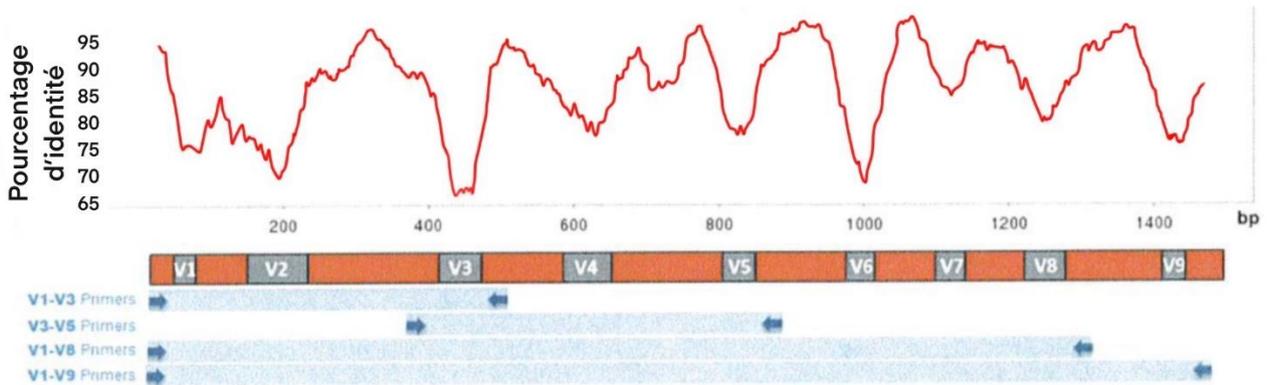


Figure 3 : différentes régions d'ADN codant pour l'ARN 16S, les amorces sont représentées par des flèches et sont situées dans les régions peu variables (en orange) (d'après Oikonomou *et al.* 2020)

L'amplification par PCR nécessite plusieurs étapes (Figure 4). Dans un premier temps, l'ADN contenu dans l'échantillon est dénaturé par une action thermique (l'échantillon est placé dans un milieu à 94-96°C), ce qui dissocie les deux brins d'ADN car les liaisons hydrogènes ne sont pas maintenues à cette température. La deuxième étape est l'hybridation : l'ADN dénaturé est alors mis en contact avec des amorces spécifiquement choisies (dans le cas des études sur le microbiote mammaire bovin, elles sont compatibles avec des régions non variables et universelles codant pour l'ARNr 16S, afin d'amplifier l'ADN de toutes les bactéries présentes dans l'échantillon), ces amorces créent alors de nouvelles liaisons avec l'ADN dénaturé. La dernière étape, l'élongation, consiste en la synthèse d'un nouveau brin d'ADN par une ADN polymérase à partir de l'amorce. Ce cycle est classiquement répété entre 40 et 50 fois ce qui induit une augmentation exponentielle du nombre de copies de gènes (Mathys *et al.*, 2007).

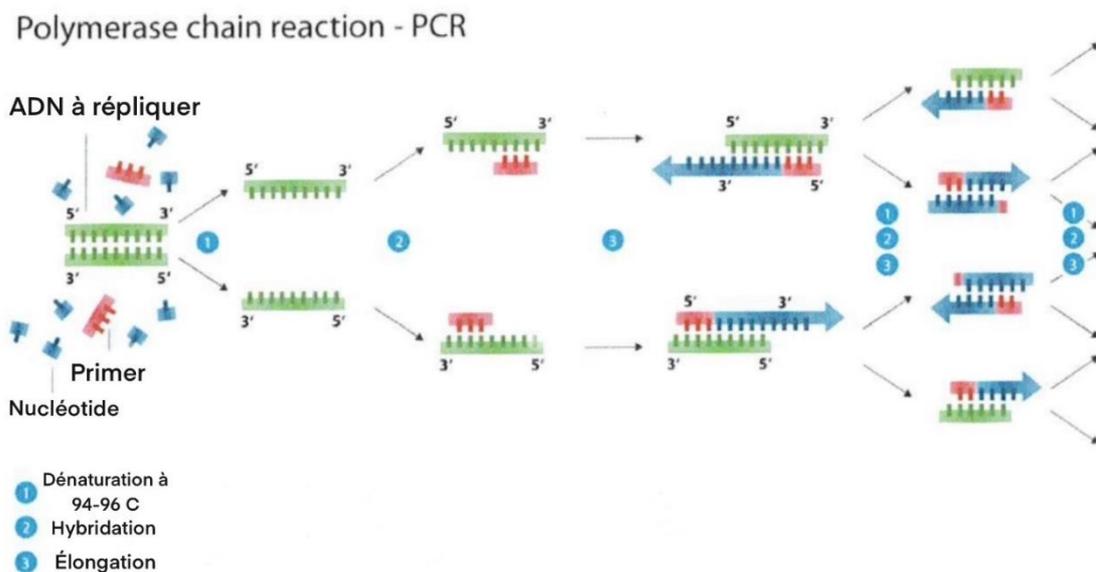


Figure 4 : principe de la PCR (d'après <https://www.KrobsPro.ch>)

1.1.3 Séquençage

Historiquement, le séquençage de l'ADN repose sur deux principes opposés : l'approche Sanger, aujourd'hui la plus utilisée, basée sur la synthèse d'ADN radiomarqué et celle de Maxam et Gilbert basée sur le clivage chimique de l'ADN radiomarqué.

La méthode Sanger (Figure 5) repose sur l'incorporation en cours de synthèse d'analogues de nucléotides appelés didésoxyribonucléotides (ddNTP) par l'ADN polymérase. Un mélange de désoxyribonucléotides (dNTP) et de ddNTP radiomarqués est utilisé pour que l'incorporation aléatoire des ddNTP entraîne la terminaison de la synthèse du brin complémentaire. De ce fait, les réactions avec les 4 ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) obtiennent alors autant de fragments de tailles différentes que de nucléotides présents sur la séquence analysée. Les produits radiomarqués des 4 réactions sont déposés sur 4 pistes de gel parallèles puis le gel est exposé à un film radiosensible. La lecture des 4 pistes permet alors d'identifier par leur taille tous les fragments se terminant par T, G, C, ou A ce qui permet de décrypter des fragments de séquence ADN jusqu'à 1000 nucléotides maximum (1 kilobases). Ainsi, en 1977 la séquence complète du génome du phage phi 174 fut établie (Sanger *et al.*, 1977).

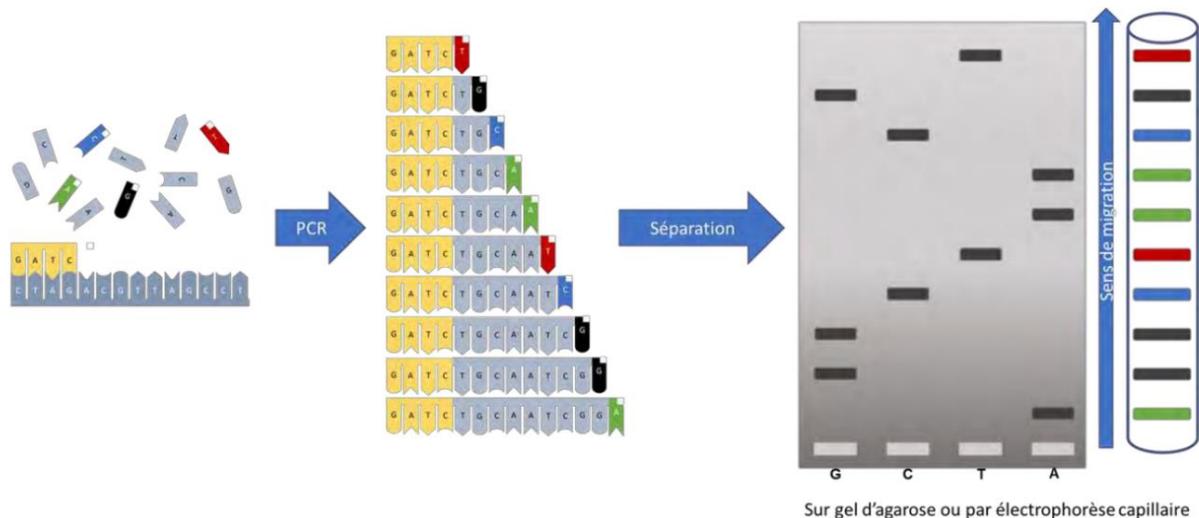


Figure 5 : principe du séquençage par la méthode Sanger (d'après <https://www.biomigene.fr>)

A notre connaissance, toutes les études du microbiote mammaire bovin publiées à ce jour utilisent du « séquençage de nouvelle génération » (NGS). Basé sur la méthode Sanger, celui-ci permet de séquencer un nombre bien plus important de nucléotides (on parle en mégabases, voir gigabases) ce qui entraîne un traitement bio-informatique des données récoltées indispensable. On peut alors fragmenter un génome complet ou une partie spécifique du génome (séquençage ciblé), dans ce cas les fragments spécifiques sont soit amplifiés par PCR comme c'est le cas dans les études sur du microbiote mammaire bovin, soit sélectionnés par hybridation. Les séquences alors obtenues sont traitées bio-informatiquement pour devenir des « reads » qui seront comparés à un génome de référence (ce procédé est alors appelé alignement), les outils bio-informatiques peuvent aussi identifier des variations de séquences par rapport à celles de référence et la génération de fichiers contenant la liste de ces variations, appelés Variant Calling Files (VCF) (Pernin-Grandjean, 2019).

La méthode développée par Illumina® est la plus répandue dans la littérature. Elle repose sur l'incorporation puis la lecture de marqueur fluorescent lors de synthèse d'ADN double brin.

1.2 Métagénomique

Les études méta-génomiques se limitent principalement à l'identification des bactéries au niveau du genre, empêchant l'exploration de la diversité du microbiote au niveau de l'espèce ou encore des souches. Cette identification peut être atteinte en réalisant un séquençage global de l'ADN avec une technique métagénomique. Cette technique consiste en une fragmentation de tous les ADN présents dans l'échantillon en courts fragments suivi d'un séquençage haut débit (*Shotgun sequencing*), un logiciel informatique permet ensuite de repérer les génomes présents. Peu d'études sur le microbiote mammaire utilisant des approches métagénomiques globales ont été réalisées chez les bovins (Bhatt *et al.*, 2012; Hoque *et al.*, 2019) et chez la femme (Jiménez *et al.*, 2015). Ces études ont permis d'explorer les communautés archéennes, fongiques et virales en plus des communautés bactériennes. En outre, elles ont donné accès à un profilage plus fonctionnel de ces communautés microbiennes. Chez les bovins, des approches intermédiaires entre les approches métagénomiques et métagénétiques ont également été entreprises, basées sur un séquençage métagénomique réduit, permettant une caractérisation taxonomique plus approfondie au niveau des espèces et même des souches (Avershina *et al.*, 2018).

L'assemblage des génomes peut se réaliser de deux manières différentes : basé sur des références ou *de novo*. Les méthodes basées sur des références comparent l'assemblage obtenu à une base de données contenant des génomes déjà étudiés. Elles évaluent comme des erreurs des différences entre les données et l'assemblage. Les méthodes *de novo* reposent sur les caractéristiques des données elles-mêmes en identifiant les incohérences internes pouvant être assimilées à des erreurs d'assemblage (Olson *et al.*, 2018).

1.3 Protéomique

Un autre aspect qui n'est pas encore étudié est lié aux fonctions exercées par le microbiote mammaire. Le séquençage métagénomique peut donner accès aux communautés non bactériennes ainsi qu'au profilage fonctionnel du microbiote du lait chez les bovins (Hoque *et al.*, 2019, Parnanen *et al.* 2018) et chez la femme (Jiménez *et al.*, 2015). Dans de nombreux cas, les protéines exprimées et leurs fonctions biologiques associées peuvent changer bien que les profils taxonomiques subissent des variations relativement mineures (Huttenhower *et al.*, 2012). L'étude de l'expression protéique et les fonctions microbiennes du microbiote du lait par analyse protéomique est entravée par la très grande abondance de protéines hôtes dans le lait par rapport à la contrepartie microbienne. L'examen du métabolome du lait peut également fournir des informations utiles sur les fonctions microbiennes. Cependant, de telles approches sont toujours difficiles même dans un microbiote bien caractérisé comme dans le microbiote gastro-intestinal (GIT) humain (Smirnov *et al.*, 2016)

II- Biais et erreurs des techniques utilisées

De l'échantillonnage au séquençage en passant par l'extraction d'ADN et l'amplification par PCR, chaque étape est susceptible d'introduire des erreurs dans le séquençage final. Il peut par exemple avoir formation de fausses séquences, des mauvais assemblages entre plusieurs génomes mais également des contaminations lors des manipulations de l'échantillon. Il est important de bien connaître ces biais biologiques, techniques et humains pour les corriger et les prendre en compte lors de l'analyse de ces études.

2.1 Biais biologiques :

Les méthodes citées précédemment peuvent également entraîner des biais biologiques (Johnson *et al.*, 2019; Větrovský & Baldrian, 2013).

Dans l'étude de Metzger *et al.* (2018), tous les échantillons prélevés et analysés par bactériologie (Jost *et al.*, 2013) se révèlent négatifs après culture (Metzger *et al.*, 2018). De plus, si l'on compare les méthodes de culture et de méta-génomique, on observe que l'utilisation de la PCR en temps réel quantifie la charge bactérienne dans les échantillons récoltés avec une médiane comprise entre 10^4 et 10^5 bactéries/ml, alors que la quantification par des méthodes utilisant la culture révèle une médiane entre 10^2 et 10^4 bactéries/ml, suggérant ainsi que les bactéries identifiées sont non viables, ou *a minima* non cultivables. (Boix-Amorós *et al.*, 2016 ; Falentin *et al.*, 2016 ; Jost *et al.*, 2013)

Cependant, les approches bactériologiques ne ciblent que les bactéries cultivables dans des conditions particulières *in vitro* : les isolats dépendront donc des milieux utilisés, du stockage des échantillons et des conditions de croissance (Oikonomou *et al.*, 2020). En effet, Jost *et al.* (2013) ont rapporté que 90% des souches isolées correspondaient à *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Propionibacterium* alors que leur abondance relative en utilisant le séquençage PCR n'était que de 24%. Cette différence d'abondance relative s'explique notamment par la facilité de culture de ces souches comparée à celle d'autres bactéries telles que les anaérobies obligatoires, y compris *Bifidobacterium* et *Veillonella*, qui ont également été isolées mais avec une faible abondance relative, comparée à celle trouvée par méta-génomique. Ce constat suggère alors que la partie vivante du microbiote du lait n'a peut-être pas été complètement ou correctement explorée jusqu'à présent. De plus, en médecine humaine, des études ont rapporté la présence de bactéries viables dans le lait maternel de femmes ne présentant pas de signe de mammite. Ces études ont démontré la viabilité des bactéries par leur mise en culture, ou en montrant leur activité par mesure des protéines produites par ces bactéries (Beasley & Saris, 2004; Heikkilä & Saris, 2003).

Certaines méthodes ont été développées pour amplifier sélectivement les fractions complètes de l'ADN des populations bactériennes sur la base de l'utilisation du propidium monoazide (Erkus *et al.*, 2016). Cependant, cela n'a été utilisé que pour retrouver les composants microbiens de fromage mais pourrait être appliqué pour la recherche du microbiote mammaire, soulevant ainsi le doute sur la viabilité des genres retrouvées par méta-génomique.

Pour ce qui est de la quantification des clades (groupement de bactéries avec une affiliation phylogénétique), les copies des gènes étudiés varient selon les organismes ce qui empêche la quantification directe par simple comptage de copies. Le nombre de copies de gènes peut être différent au sein d'un même clade ou être le même pour des clades proches qui auraient une séquence identique, ce qui complexifie la détermination de l'abondance des espèces. (Větrovský & Baldrian, 2013)

2.2 Biais et erreurs d'échantillonnage

La pratique la plus courante pour l'échantillonnage du lait des vaches est la récolte manuelle (Oikonomou *et al.*, 2014). Par celle-ci, il est très difficile de collecter le lait de manière aseptique en raison des fragments de peau, de la poussière et des poils dans l'environnement introduisant une contamination bactérienne dans l'échantillon.

De plus, afin d'identifier et dénombrer les bactéries, les études réalisent entre 30 et 50 cycles de PCR en temps réel. Cette pratique pourrait conduire à des résultats faussement positifs, en amplifiant des contaminants.

Dans la plupart des études mentionnées, le microbiote a été exploré lors d'une traite manuelle. Il reste donc à déterminer si le microbiote peut être présent et similaire lors qu'il est prélevé directement à l'intérieur de la mamelle. Une étude utilisant un prélèvement direct de lait dans la citerne à l'aide d'une aiguille et d'un tube vide stérile a montré que pour les quartiers sains (avec un nombre faible de cellules somatiques) la composition du microbiote mammaire différait de celui trouvé par la méthode de traite manuelle, considérée comme plus contaminante. De manière inattendue, le taux de réussite de l'amplification par PCR était encore plus élevée dans les échantillons prélevés par ponction transcutanée aseptique (83%) par rapport aux échantillons prélevés de manière conventionnelle par éjection via le trayon et son canal (traite manuelle) (45 et 40%, respectivement), suggérant que les bactéries trouvées par PCR se trouvent effectivement à l'intérieur de la glande mammaire et ne contaminent pas dans le lait lors de l'échantillonnage par traite manuelle (Metzger *et al.*, 2018).

Metzger *et al.* (2018) ont séquencés des témoins négatifs (sans matrice d'ADN) afin d'identifier les contaminations lors du séquençage ou de l'amplification. Les chercheurs ont alors exclu les clades présents dans les témoins négatifs, afin d'exclure les contaminations externes. Ce n'est malheureusement pas le cas pour la majeure partie des études publiées sur le microbiote mammaire humain ou bovin.

2.3 Biais techniques

A) Biais d'extraction

La méthode d'extraction d'ADN doit être optimisée pour chaque échantillon. Les kits d'extractions sont plus ou moins performants pour différents clades selon la matrice utilisée, l'étape de lyse (spécificité enzymatique) et les espèces en présence. Pour illustrer ce propos, dans l'étude de Knudsen *et al.* (2016), l'ADN de plusieurs matrices a été extrait en utilisant plusieurs kits d'extraction avec des résultats d'espèces identifiées très différents selon les kits utilisés. Afin d'affiner le choix du kit les auteurs conseillent de réaliser des tests d'affinité sur des communautés synthétiques de clades attendus afin d'identifier le kit le plus adapté (Knudsen *et al.*, 2016). Cependant, aucune étude sur le microbiote mammaire bovin ne fait part de tels tests au préalable et toutes utilisent des kits d'extraction différents entraînant fatalement des résultats non identiques et difficilement comparables. Sur la Figure 6, on observe le taux d'utilisation d'un kit dans les études sur le microbiote mammaire bovin publiées à ce jour (30 études ont été comparées).

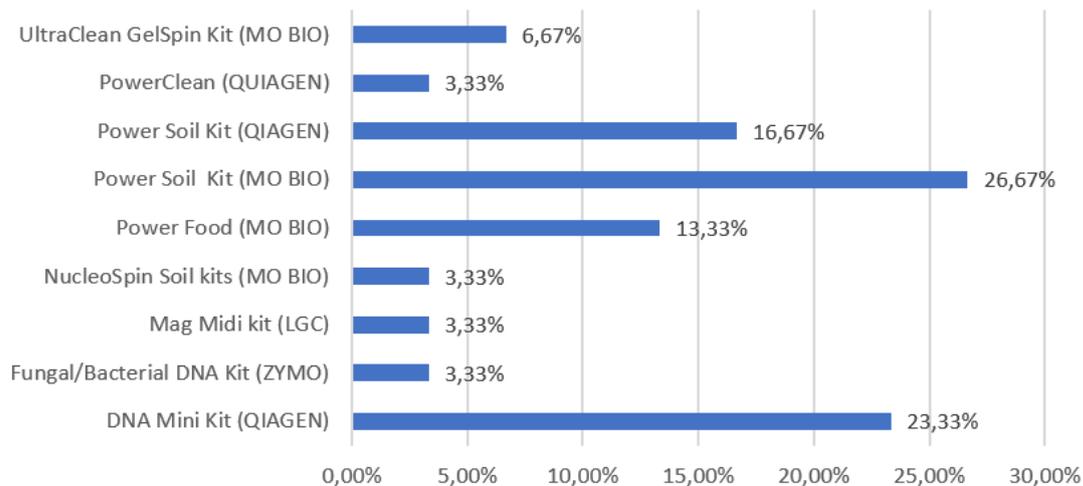


Figure 6 : taux d'utilisation des Kits d'extractions utilisés dans les études sur le microbiote mammaire bovin

Les résultats de l'identification, de la quantification et la diversité microbienne sont également influencés par le processus d'isolement de l'ADN. Dans l'étude de Knudsen *et al* (2016), il a été montré que la quantité microbienne était similaire entre les différents résultats lorsque le type d'isolement utilisé est identique. Dans l'ensemble, les quantités d'ADN obtenues à partir de chaque kit d'ADN utilisé différaient grandement, de même pour la diversité et la composition de la population. La composition du microbiome taxonomique semble ainsi dépendre à la fois de l'échantillon et de la méthode d'isolement de l'ADN (Knudsen *et al.*, 2016).

Comme vu précédemment, les kits d'extraction eux-mêmes peuvent être une source de contamination. Cette contamination est amplifiée lors de cas de faible concentration d'ADN à extraire. Elle peut également être différente d'un kit à l'autre (Salter *et al.*, 2014). Dans ce cas, il est conseillé d'introduire au sein des échantillons un témoin négatif pour identifier les espèces contaminantes (Glassing *et al.*, 2016). Cependant seules quelques études ont utilisé un témoin négatif, dont celle de Metzger *et al.*, (2018). L'utilisation de techniques de biologie moléculaire hautement sensibles pour explorer le microbiote et le microbiome dans des échantillons environnementaux et tissulaires ont détecté la présence d'ADN microbien contaminant dans les réactifs. Ces contaminants peuvent fausser les distributions taxonomiques et les fréquences relatives dans les ensembles de données microbiennes ainsi que contribuer à des interprétations et des identifications erronées (Glassing *et al.*, 2016).

L'extraction de l'ADN dépend également de la fraction laitière (colostrum, lait), des filtres utilisés ainsi que des conditions de conservation de l'échantillon (Knudsen *et al.*, 2016; Rintala *et al.*, 2017). De même, les résultats PCR dépendent du gène ciblé, du nombre de cycles réalisés, des amorces utilisées, de la composition réelle de l'échantillon ainsi que du nombre de copies initiales du gène recherché (Schloss *et al.*, 2011; Tremblay *et al.*, 2015). Le fait que chaque étude utilise une méthode d'extraction et d'amplification particulière, dans des conditions de conservation et d'analyse différentes propres à chaque laboratoire, ceci rend l'interprétation et la comparaison de leurs résultats respectifs délicates.

b) Biais d'amplification

L'amplification par PCR a généralement un taux d'erreur de 1 pour 105 à 106 bases (un gène au hasard est pris pour une amorce alors que ce n'est pas le gène cible) (Cline *et al.*, 1996). Lorsque l'amplification est réalisée dans une communauté microbienne hétérogène, le taux de chimérisme serait compris entre 5 et 45 % (Haas *et al.*, 2011).

Les chimères sont des séquences artificielles produites au cours de la PCR. Lorsqu'une séquence en cours d'élongation se détache de sa matrice, elle est susceptible de se ré-hybrider à un brin matrice différent lors des cycles suivants, et ainsi former une molécule chimérique. Cette chimère, composée de la séquence de deux ou plusieurs brins matrices, n'a aucune existence dans l'échantillon de départ mais devient présente dans l'échantillon après la PCR et sera donc séquencée. Les chimères étant des sous-produits de PCR, leur abondance est donc nécessairement plus faible que les séquences réelles. Elles peuvent cependant conduire à la création de clades chimériques, en abondance faible (Bachy *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2015).

De plus, le rendement de l'amplification par PCR dépend de la séquence elle-même : l'hybridation des amorces est influencée par d'éventuels « mésappariements » avec la matrice, la polymérase peut se « mésappareiller » davantage sur certaines régions du fait de la séquence ou de structures secondaires. Sans qu'on sache encore le prédire, on peut donc avoir des différences d'efficacité d'amplification selon les séquences matrices, ce qui conduit à des abondances biaisées avant et après PCR. Ce type de biais ne peut être corrigé à l'heure actuelle (Aird *et al.*, 2011).

Ici on souligne que les amorces choisies par les études sont différentes, ce qui entraîne des résultats non similaires et non comparables (Figure 7)

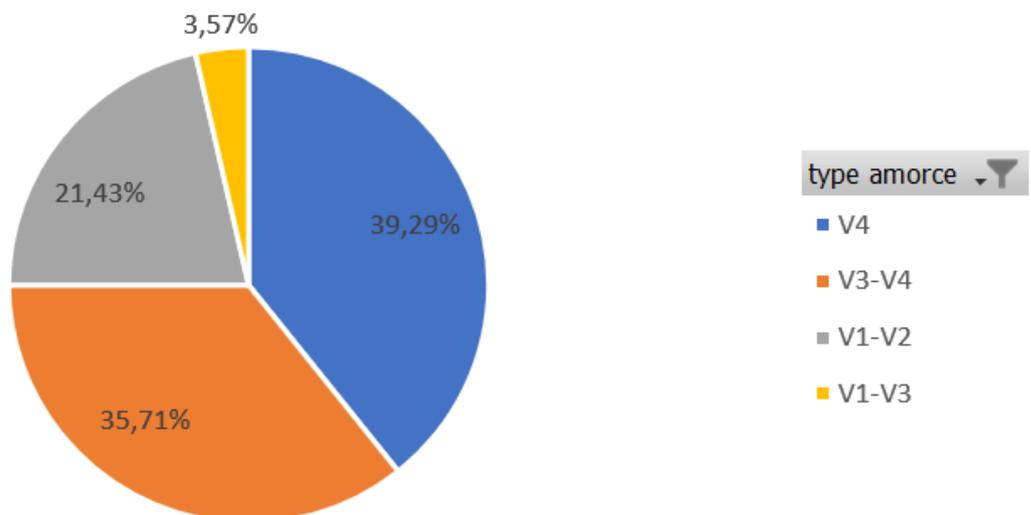


Figure 7 : taux d'utilisation des amorces de la séquence 16S utilisées dans 30 études sur le microbiote mammaire bovin

c) Biais lors du séquençage

Comme pour le biais biologique, le nombre de copies de l'ADN 16S varie selon les organismes, et ces copies peuvent avoir des séquences différentes (Větrovský & Baldrian, 2013). Par ailleurs, les différents biais dans les étapes précédentes peuvent générer des erreurs dans les lectures des séquençages. De plus, les banques de données génétiques avec lesquelles sont comparées les séquences afin de déterminer les genres et familles de bactéries ne sont pas exhaustives. De ce fait, il est impossible de faire une assignation taxonomique directe et complète, ni de compter les séquences pour estimer l'abondance des communautés.

Pour regrouper les lectures de gènes correspondantes à un même groupe, les études utilisent les OTU (unité taxonomique opérationnelle). Les lectures sont alors alignées et comparées et les relations entre deux séquences sont exprimées en pourcentage de similarité ou de divergence. Le seuil de 98,65% de similarité est utilisé classiquement pour différencier deux espèces bactériennes (Kim *et al.*, 2014). Cependant, ce seuil est variable selon le groupe taxonomique, ce qui peut engendrer des erreurs.

La précision du regroupement OTU dépend de l'algorithme utilisé, mais aussi du prétraitement des lectures tels que la suppression des lectures de faible qualité et de séquences de chimères qui pourraient être générées pendant l'amplification. Une approche sélective utilisant un filtrage de qualité trop stricte peut conduire à une perte d'informations affectant particulièrement les espèces les moins abondantes, tandis que le regroupement de lectures de faible qualité peut produire des OTU fausses conduisant à une surestimation de la complexité des échantillons analysés (Albanese *et al.*, 2015). Pour un échantillon avec des enregistrements de séquences provenant de *phyla* connus, il a été estimé que 3% des données publiques pourraient contenir des chimères. De plus, étant donné que les gènes d'ARNr provenant de l'ADN environnemental sont généralement amplifiés par PCR, on soupçonne que de nombreuses séquences chimériques sont intercalées dans les bases de données publiques (Ashelford *et al.*, 2005). L'effet de ces données de mauvaise qualité a conduit à plusieurs taxonomies qui se contredisent entre les différentes études.

Des erreurs de séquençage *sensu stricto* sont des erreurs de lecture par le séquenceur, elles dépendent de la technologie de séquençage. La technologie 454 (utilisant le pyroséquençage) introduit des insertions/délétions tandis que la technologie Illumina® entraîne des erreurs de lectures (Nelson *et al.*, 2014). Or, la majorité des études sur le microbiote mammaire bovin utilisent la technologie Illumina®, ce qui nous amène à remettre en cause l'exactitude des résultats obtenus.

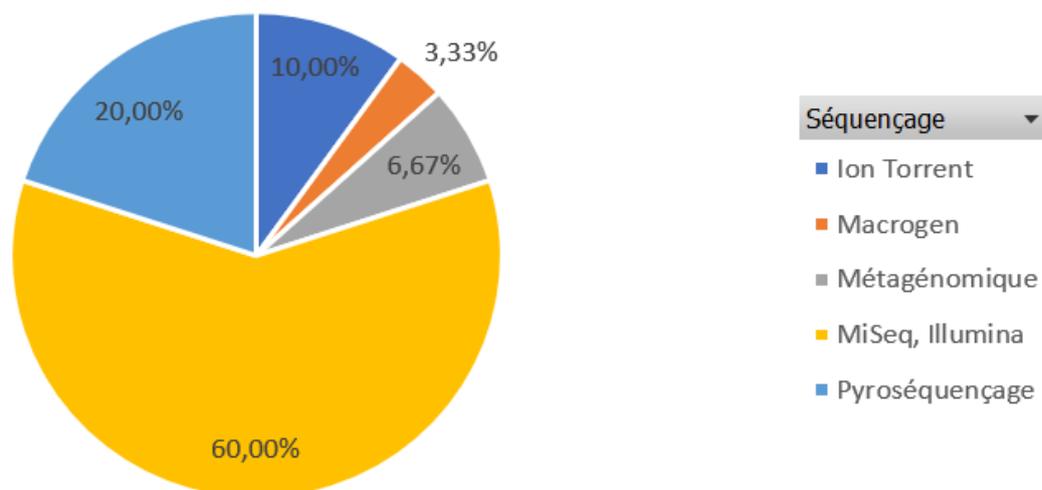


Figure 8 : taux d'utilisation des différentes technologies de séquençage dans l'ensemble des études analysées sur le microbiote mammaire bovin

d) Biais de la métagénomique

Les ADN répétés au sein d'un même organisme ou partagés par des organismes distincts entraînent une complexité de l'assemblage métagénomique. La complexité de l'assemblage est directement liée au rapport entre la longueur du séquençage et la longueur de la répétition. Les répétitions intergénomiques sont généralement petites tandis que les répétitions intragénomiques peuvent être de la totalité des chromosomes pour des souches étroitement apparentées.

En raison de la complexité du problème d'assemblage du métagénome, quel que soit l'algorithme d'assemblage utilisé ou la méthode de séquençage, les assemblages de métagénomes sont incomplets et contiennent des erreurs. Les méthodes d'évaluation de la qualité et de l'exhaustivité des assemblages sont donc essentielles pour éclairer les analyses en aval des données assemblées et pour permettre aux chercheurs de comparer différents outils qui pourraient être utilisés pour l'assemblage.

Les méthodes de validation fondées sur des références comparent l'assemblage à une base de données contenant des gènes ou des génomes précédemment assemblés. Elles évaluent comme des erreurs les différences identifiées entre les données assemblées et la collection de référence. En revanche, les méthodes *de novo* reposent sur les caractéristiques des données assemblées elles-mêmes, cherchant à identifier les incohérences internes indicatives d'erreurs d'assemblage potentielles. Les méthodes basées sur des références sont particulièrement efficaces dans les expériences de comparaison, tentant de reconstruire des communautés avec une composition connue ; cependant, ces méthodes ont une efficacité limitée dans les ensembles de données réelles. Par exemple, par la métagénomique les segments provenant d'un génome pour lesquels aucune séquence de référence n'est disponible ne peuvent pas être vérifiés par une approche basée sur les références. Il est également difficile de déterminer si les différences sont des erreurs ou de véritables différences entre la séquence de référence et son parent au sein du mélange métagénomique (Olson *et al.*, 2018).

BILAN

Bien que la présence de micro-organismes dans le lait soit étayée par un vaste ensemble d'enquêtes dans le monde entier chez différents hôtes, il convient de garder à l'esprit que les échantillons et les méthodes qui ont été utilisés ne sont pas infallibles et contiennent de nombreux biais, ce qui engendre des limites aux conclusions qui peuvent être tirées.

Partie II- Résultats des études récentes

I- La composition du microbiote est complexe

D'après les études disponibles sur le microbiote mammaire, le lait des vaches contiendrait une population complexe et variée de bactéries, dont la richesse est estimée à environ 10^3 - 10^4 UFC par millilitre. La diversité de ces bactéries est très importante, avec une abondance relative propre à chaque individu, voir à chaque quartier mammaire (Addis *et al.*, 2016). Une étude utilisant la technique métagénomique aurait identifié 146 souches bactériennes différentes au sein d'un même échantillon de lait (Hoque *et al.*, 2019).

La majorité des études a démontré que les principaux *phyla* bactériens présents dans le lait sont les Firmicutes, les Protéobactéries, les Bactéroïdes et les Actinobactéries. *Staphylococcus*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Propionibacterium*, *Stenotrophomonas*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Comamonas*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, et *Fusobacterium* sont les genres de bactéries les plus fréquemment détectés en utilisant une technique de métagénomique. (Albonico *et al.*, 2020; Bonsaglia *et al.*, 2017; Ganda *et al.*, 2016; Kuehn *et al.*, 2013; Oikonomou *et al.*, 2012.). *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales*, *Clostridiales* et *Pseudomonas* ont également été identifiés comme des constituants prédominants d'un microbiote sain de colostrum (Lima *et al.*, 2017). Des profils bactériens du lait maternel humain similaires ont été obtenus en utilisant une approche métagénomique (Jiménez *et al.*, 2015). De telles approches ont également permis de décrire la présence d'ADN fongique, protozoaire et viral dans les échantillons de lait. La diversité du microbiote du lait maternel humain a également été soutenue par des approches dépendantes de la culture, qui au-delà des genres dominants *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Propionibacterium* ont permis l'isolement de membres de *Bifidobacterium*, *Rothia*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, voire de germes anaérobies obligatoires tels que *Veillonella* (Perez *et al.*, 2007; Jost *et al.*, 2013).

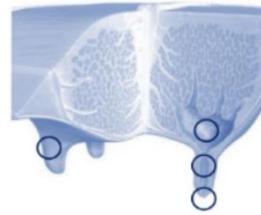
Cependant, Metzger *et al.* (2018) ont étudié les différentes techniques d'échantillonnage utilisées pour l'analyse du microbiote mammaire et ont suggéré que la détection des bactéries du genre *Pseudomonas* pourrait être attribué à la simple contamination des échantillons, en effet *Pseudomonas* est l'un des genres bactériens trouvés de façon très abondante dans leurs échantillons sur substrat stérile, nous pouvons donc nous interroger sur la présence réelle de ce phylum dans le microbiote mammaire. (Metzger *et al.*, 2018)

Le microbiote mammaire étant largement étudié chez l'Homme, certaines similarités avec le microbiote bovin ont été démontrées (Figure 9). Néanmoins, des différences significatives ont été observées entre les populations microbiennes humaines, bovines et d'autres ruminants, suggérant une adaptation microbienne à l'hôte, bien que l'influence de l'environnement ne soit pas exclue (Li *et al.*, 2017). Cette comparaison entre les différents hôtes nous invite à réfléchir sur l'existence d'un microbiote mammaire universel, des investigations complémentaires avec une standardisation des méthodes serait nécessaire pour répondre à cette question.



Femme

Ralstonia
 Roseburia
 Clostridium
 Corynebacterium
 Faecalibacterium
 Lactobacillus
 Bifidobacterium
 Propionibacterium
 Pseudomonas
 Staphylococcus
 Streptococcus
 Bacteroides
 Avinetobacter
 Veillonella
 Lachnospiraceae
 Ruminococcaceae
 Enterococcus
 Prevotella
 Weisella
 Leuconostoc
 Lactococcus
 Citrobacter



Vache

Microbacterium
 Pediococcus
 Fusobacterium
 Propionibacterium
 Acinetobacter
 Bifidobacterium
 Pseudomonas
 Staphylococcus
 Streptococcus
 Lachnospiraceae
 Corynebacterium
 Bacteroides
 Enterococcus
 Ruminococcaceae
 Aerococcus
 Psychrobacter
 Enterobacter

Figure 9 : comparaison entre les principaux taxons du microbiote mammaire chez la femme et les bovins (d'après Oikonomou et al., 2020).

Le microbiote peut comprendre des bactéries, des virus, des champignons et d'autres micro-organismes. Jusqu'à présent, les recherches se sont principalement concentrées sur la composante bactérienne du microbiote du lait. Cependant, beaucoup d'entités fongiques et virales pourraient être présente en association avec des bactéries. L'exploration des populations fongiques vient de commencer dans le lait maternel humain et bovin mais ne donne pas encore de résultats probants. (Boix-Amorós et al., 2017, 2019 ; Derakhshani et al., 2018a).

II- Facteurs de variabilité

2.1 L'environnement

En médecine bovine

Chez les bovins, il semble que la conduite d'élevage notamment l'alimentation influence la composition du microbiote mammaire. L'influence de la localisation géographique des élevages sur la composition du microbiote n'a pas été étudiée chez la vache, mais des études menées sur l'environnement de l'animal et les pratiques zootechniques ont rapportées une relation entre la composition microbienne du lait et le type de litière utilisée, les différentes pratiques de traite (notamment les moyens de préparation des trayons), et le régime alimentaire (Derakhshani, et al., 2018a; Doyle et al., 2017; Metzger et al., 2018).

Une étude a également analysé si l'alpage entraînait une variation, et a retrouvé des différences entre les microbiotes des vaches de plaine et des vaches en alpage. En effet, des analyses métagénomiques ont été réalisées dans le but d'étudier l'évolution microbienne du lait avant, pendant et après la transhumance estivale en comparant notamment les deux lots de vaches d'un

même élevage, un partant en transhumance et un restant dans la ferme, afin de déterminer si l'alpage pouvait influencer directement le microbiote du lait. Les données ont montré que le lait alpin présentait une réduction significative des genres *Pseudomonas* et une augmentation des genres *Lactococcus*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. Tous les changements microbiens ont disparu lorsque les vaches ont été ramenées de l'alpage à la ferme couverte (Carafa *et al.*, 2020).

Cependant, nous ne connaissons pas encore les facteurs exacts qui influencent la variation du microbiote et l'impact de cette variation sur les caractéristiques du lait et de sa qualité (Addis *et al.*, 2016).

En médecine humaine

Une étude importante sur l'influence géographique sur le microbiote a montré des différences selon les zones géographiques de vie significatives entre le microbiote du lait des femmes en Espagne, Finlande, Afrique du Sud et Chine. Il faut cependant être prudent sur son interprétation car ces différences géographiques pourraient être dues à plusieurs facteurs, tels que l'environnement, l'alimentation ou même la génétique (Kumar *et al.*, 2016).

Il a également été démontré que la population bactérienne du lait maternel était en étroite corrélation avec le régime alimentaire. En effet, il y a une relation entre l'apport d'acides gras saturés et mono-insaturés, de glucides et de protéines, et la variation de la composition du microbiote mammaire (Kumar *et al.*, 2016). Des différences ont également été trouvées dans le microbiote du lait maternel en relation avec le mode d'accouchement (Cabrera-Rubio *et al.*, 2012; Khodayar-Pardo *et al.*, 2014). En effet, une plus grande diversité bactérienne a été trouvée dans le lait des femmes ayant accouché par voie basse par rapport aux femmes ayant accouché par césarienne. La césarienne pourrait en effet affecter le microbiote du nourrisson et par là affecter celui du lait lors de l'allaitement. Cependant, une autre étude n'a trouvé aucune preuve de différences statistiquement significatives entre les profils microbiologiques du lait prématuré et à terme, après césarienne (élective ou d'urgence) et après accouchement par voie basse (Urbaniak *et al.*, 2016). De plus, de telles études n'ont pas d'équivalent pour les troupeaux bovins bien que les implications en médecine bovine seraient importantes, surtout pour les races avec une prédisposition génétique à la césarienne.

2.2 La fraction laitière

En médecine bovine

Les variations de populations bactériennes retrouvées dans les différents articles pourraient s'expliquer par la richesse et la composition du lait. En effet, une étude sur la comparaison du microbiote du lait et du colostrum a montré une différence de composition des microbiotes pour un même individu au cours d'une même lactation (Derakhshani *et al.*, 2018b), ce qui serait dû à la différence de composition du substrat. En ce sens, dans une autre étude sur des vaches laitières issues de troupeaux expérimentaux, une alimentation plus riche en concentrés a entraîné des changements dans la composition du microbiote du lait associé à un changement important dans le taux butyrique du lait, avec une plus grande abondance de bactéries pathogènes associées à des mammites et à une mauvaise qualité de lait (Tong *et al.*, 2019).

Le microbiote du lait bovin varie également avec le temps, à la fois avec le stade et le nombre de lactations. Il a récemment été démontré que le colostrum abritait un microbiote complexe et

diversifié, dont la richesse était significativement plus élevée chez les vaches primipares que chez les vaches multipares (Lima *et al.*, 2017). Les profils taxonomiques et la diversité seraient également liés au stade de lactation et varieraient au cours de la première semaine de lactation (Derakhshani *et al.*, 2018b).

Une étude a également comparé le microbiote contenu dans le lait et celui contenu dans les tissus des glandes mammaires récoltés à l'abattage. *Corynebacterium* a été identifié comme principal genre bactérien dans les deux échantillons, mais il est présent en plus grande concentration dans le lait. La diversité était significativement différente entre les deux matrices (Pirard *et al.*, 2021). Il existe donc des différences entre le microbiote du tissu mammaire et celui du lait récolté, ce qui pourrait remettre en cause les études se concentrant uniquement sur la fraction laitière.

En médecine humaine

Il a été montré que la composition du lait maternel humain change également avec le temps, entre le colostrum, la transition et le lait mature avec notamment une augmentation des genres bactériens couramment retrouvés dans la cavité buccale (Boix-Amorós *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 2017). Les auteurs suggèrent alors que cette évolution est notamment due à l'allaitement et l'ensemencement de la mamelle depuis la cavité buccale du nourrisson (Murphy *et al.*, 2017).

2.3 Les variations individuelles

Dans certaines études, une grande variation individuelle entre les ruminants d'un même troupeau a été notée aussi bien dans la composition que dans la richesse du microbiote (Oikonomou *et al.*, 2014, Albonico *et al.*, 2020; Bonizzi *et al.*, 2009; Catozzi *et al.*, 2019).

Chez les bovins, plusieurs facteurs associés à l'hôte sont susceptibles d'influencer le microbiote mammaire tels que les paramètres physiologiques et les caractéristiques anatomiques du trayon, qui sont des traits génétiques (Derakhshani *et al.*, 2018b).

BILAN

Le microbiote peut être alors influencé par de nombreux facteurs. Nous avons à l'heure actuelle un aperçu des facteurs qui influencent la composition et l'abondance relative du microbiote mammaire. Ces facteurs sont nombreux et parmi eux : le stade de lactation, la parité, les traits génétiques, l'alimentation, la localisation géographique, les pratiques de gestion, l'hygiène de traite, la santé de l'animal mais la liste reste incomplète pour le moment. Il manque encore de nombreuses informations pour expliquer certaines variations, et toutes les possibilités n'ont pas encore été explorées. Une meilleure compréhension de ces facteurs, leur importance relative, leurs effets à court et long terme, et la résilience de ce microbiote aux perturbations semble indispensable pour avancer sur le sujet.

III- Avec une capacité de résilience

Partant du postulat de la présence d'une population bactérienne dans le lait bovin, il est important d'étudier sa capacité de régénération, face à un incident induisant un changement drastique de la composition et de la richesse du microbiote, tel qu'une infection par un agent pathogène ou l'utilisation d'antibiotiques.

Dans l'étude de Bonsaglia *et al.*, 2017, le microbiote a été évalué juste avant le tarissement. Puis trois protocoles ont été utilisés : le premier sans traitement, le second avec des bouchons de trayons et le troisième avec du ceftiofur en excipient retard infusé par voie intramammaire et des bouchons de trayon. Le microbiote a ensuite été réévalué à 7 jours post-partum. La conclusion de cette étude est que dans les 3 cas la diversité ou la concentration du microbiote reste inchangée, ce qui impliquerait une régénération du microbiote après l'utilisation d'antibiotiques, ainsi qu'aucune colonisation de la mamelle par de nouvelles espèces de bactéries pendant la période sèche chez les vaches non traitées et sans la présence de bouchons.

Dans une autre étude, le microbiote mammaire a été étudié avant une infection induite à *Escherichia coli*, à un jour puis à 9 jours post infection, deux lots ont été formés, un sans antibiotiques et un avec utilisation d'antibiotique intramammaire. Le premier jour, la concentration et la diversité semble très réduite et semble ensuite revenir à son état de base après 9 jours post-infection, quel que soit le lot (Ganda *et al.*, 2017). Les auteurs suggèrent que les communautés microbiennes sont dynamiques et que la perturbation par les antibiotiques au tarissement est annulée lors de la nouvelle lactation, et qu'elle reprend rapidement sa communauté de base lors d'une infection, grâce à une forte capacité de régénération de la flore.

Cependant, dans leur étude, Rault *et al.* (2021), les chercheurs ont analysé le microbiote de quartiers cliniquement sains au moment de l'étude mais avec des antécédents différents : un lot de quartiers n'ayant jamais eu de mammite, et un ayant eu plusieurs épisodes cliniques. Les résultats ont montré une diversité plus élevée dans les quartiers sains, ce qui montre un lien entre la composition du microbiote et de la santé mammaire, même à distance de l'épisode infectieux.

Le travail de recherche de Gryaznova *et al.*, (2021), souligne également une augmentation significative des genres *Cutibacterium*, *Blautia*, *Clostridium sensu stricto*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Microbacterium* pour les lots de vaches présentant des infections mammaires. L'abondance relative croissante des genres *Staphylococcus* et *Streptococcus* est associée à une mammite subclinique. Les données montrent qu'une augmentation relative de l'abondance des genres *Staphylococcus* et *Microbacterium* peut être un signe précoce d'infection. (Gryaznova *et al.*, 2021)

De même, dans une autre étude, la comparaison d'échantillons de lait sains et de mammites montre que la composition communautaire du microbiote de ces différents lots variait également beaucoup. Dans le lait de vaches saines, le microbiote était majoritairement composé de *Lactococcus lactis*, *Acinetobacter johnsonii* et *Bacteroides dorei*, alors que lors de mammites, il était composé principalement de *Bacillus cereus*, *Clostridium cadaveris* et *Streptococcus suis* (Ma *et al.*, 2021).

On peut également émettre l'hypothèse que lors de la détection de bactéries non vivantes par la méta-génomique, la présence des antibiotiques n'influencerait pas la composition du

microbiote détecté. Seule l'infection par un agent pathogène exercerait une influence sur la composition supposée du microbiote car un seul taxon serait largement prédominant (car le seul vivant) dans l'échantillon. En ce sens, lors de la mise en place d'antibiotiques sur des individus sains, aucun changement significatif n'a été décrit dans l'étude de Ganda *et al.* (2017), seule l'infection engendrant un changement important.

Partie III - Cohérence avec la physiologie de la mamelle

I- Postulats sur la colonisation mammaire

De nombreuses théories concernant la colonisation de la mamelle par le microbiote ont émergées à la suite des études sur le microbiote mammaire bovin. La première théorie est l'existence de l'axe entéro-mammaire.

1.1 L'axe entéro-mammaire.

La voie entéro-mammaire est une hypothèse selon laquelle certaines bactéries du microbiote gastro-intestinal ont été sélectionnées pour atteindre les sécrétions mammaires via les leucocytes sanguins chez les bovins et les souris (Fernández *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2007). Ce processus a été étudié chez les souris et les humains (Jost *et al.*, 2013) et pourrait s'appliquer aux bovins (Young *et al.*, 2015).

Les résultats de ces études ne prouvent pas définitivement cette hypothèse, mais des fragments bactériens communs aux deux microbiotes pourraient suggérer la présence de cet axe entéro-mammaire. En effet Young *et al.*, 2015 ont prélevés échantillons de leucocytes de matières fécales, de sang et de lait sur des vaches en lactation en bonne santé, et leur composition bactérienne a été étudiée en utilisant une approche métagénomique. Ils ont alors trouvé des similarités entre le microbiote mammaire et gastro-intestinal, notamment la présence de bactéries appartenant au genre *Ruminococcus*, à la famille des *Peptostreptococcaceae* et au genre *Bifidobacterium*.

Dans l'étude de Avershina *et al.*, (2018) les microbiotes mammaire, vaginal et fécal ont été comparés chez les femmes juste avant et après l'accouchement, on observe alors que les échantillons de lait sont comparables à ceux des échantillons vaginaux et fécaux d'une même mère, et qu'il y a une plus grande différence entre les individus.

Chez les femmes, l'analyse d'échantillons de lait et de sang périphérique prélevés de manière aseptique sur des femmes allaitantes en bonne santé et des excréments de mères et de nourrissons a révélé des signatures bactériennes communes, suggérant que les cellules immunitaires pourraient être capables de transporter des bactéries intestinales ou, au moins, des composants bactériens du tractus intestinal à la glande mammaire (Perez *et al.*, 2007).

Chez la souris, des souches de bactéries lactiques ont été administrées par voie orale et retrouvées dans les tissus mammaires et le lait des souris gravides et allaitantes, mais pas chez les souris témoins, n'ayant pas reçues de bactéries lactiques (Azagra-Boronat *et al.*, 2020 ; de Andrés *et al.*, 2018).

Quelques OTUs correspondant aux genres *Bifidobacterium* et *Ruminococcus* et à la famille des *Peptostreptococcaceae* ont été trouvées communes aux trois types d'échantillons (intestinal, vaginal et mammaire) chez les bovins. Cependant, il n'a pas été établi si ces OTU communes correspondaient aux mêmes souches et si ces souches étaient viables. Des investigations supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer ou infirmer l'hypothèse de transfert de bactéries viables du tractus intestinal vers le lait chez les femmes et les vaches par voie entéro-mammaire. De plus ces bactéries intestinales devraient surmonter plusieurs « pare-feu » immunologiques et tromper de manière inattendue le système immunitaire après translocation pour atteindre la glande mammaire (Poutrel & Rainard, 2017).

Dans l'étude de Catozzi *et al.* (2019), il existe peu de variations intra-individuelles entre chaque quartier mammaire dans le microbiote mammaire bovin, alors que les quartiers peuvent être indépendamment atteints de mammite. La colonisation de la mamelle pourrait alors se faire par voie ascendante lors de la traite ou l'allaitement, mais entrainerait probablement des différences entre les quartiers. Cette faible variation intra-individuelle va dans le sens que tous les quartiers sont colonisés par la même source, qui pourrait être l'axe-entéromammaire.

Malgré les obstacles à l'hypothèse de l'axe entéro-mammaire, certaines études ont avancé une base scientifique plausible. Il a été montré que les cellules dendritiques peuvent pénétrer l'épithélium intestinal afin d'absorber les bactéries dans la lumière intestinale (Figure 10). En effet, les cellules dendritiques peuvent ouvrir les jonctions serrées des cellules épithéliales afin d'envoyer des dendrites hors de l'épithélium tout en préservant l'intégralité de la barrière intestinale (Grice *et al.*, 2009).

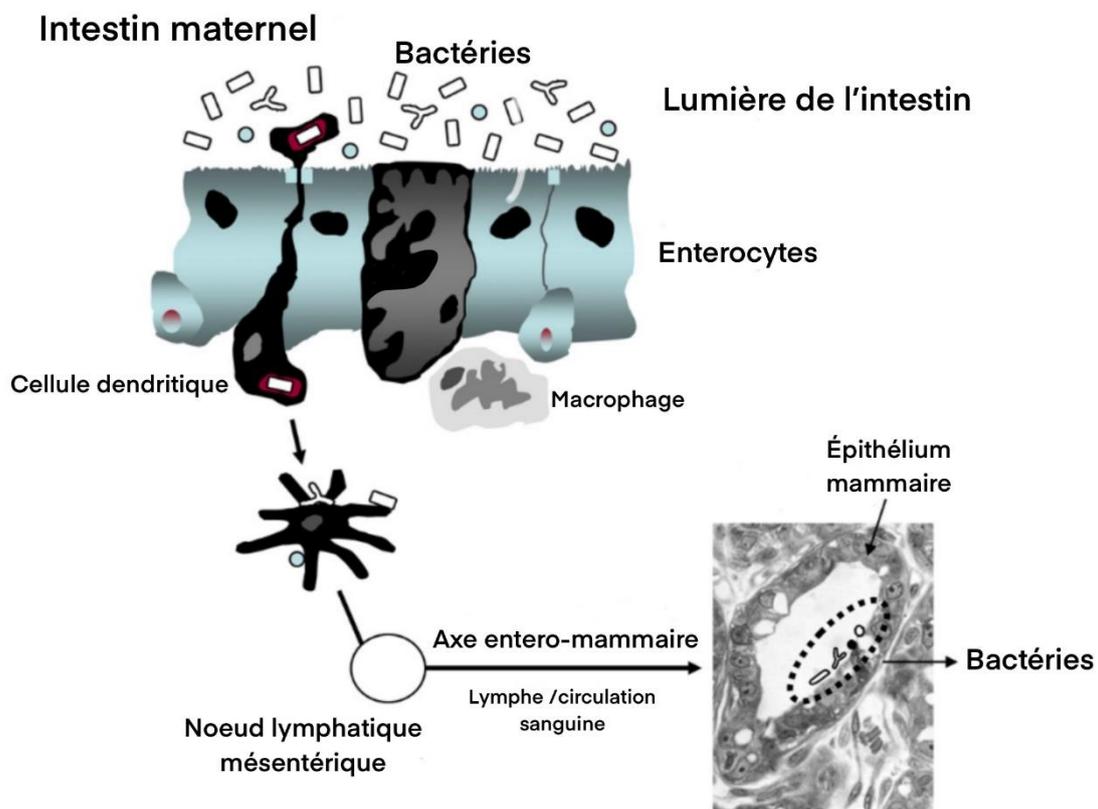


Figure 10 : fonctionnement de l'axe entéro-mammaire (d'après Rodrigez, 2014)

En utilisant un tel mécanisme, une souche de *Salmonella typhimurium* déficiente en gènes d'invasion était capable d'atteindre la rate après administration orale à des veaux (Rescigno *et al.*, 2001). Ce mécanisme n'est peut-être pas exclusif aux cellules dendritiques, car les lymphocytes CD18+, y compris les macrophages, se sont révélés essentiels à la dissémination extra-intestinale de Salmonelles non invasives (Rescigno *et al.*, 2001). Il a également été montré que les cellules dendritiques intestinales peuvent retenir de petit nombre de bactéries commensales vivantes pendant plusieurs jours dans les ganglions lymphatiques mésentériques (Fernández *et al.*, 2013).

Une fois à l'intérieur des lymphocytes et/ou des macrophages, les bactéries intestinales pourraient se propager à d'autres endroits puisqu'il existe une circulation de lymphocytes dans le GALT. Les cellules stimulées par antigène se déplacent de la muqueuse intestinale pour coloniser des surfaces muqueuses distantes, telles que celles des voies respiratoires et génito-urinaires, des glandes salivaires et lacrymales et, de manière plus significative, celle de la glande mammaire en lactation (Fernández *et al.*, 2013).

De plus, juste avant la naissance, chez la mère, il a été montré qu'il y a une forte stimulation de deux marqueurs d'activation des cellules dendritiques : le complexe d'histocompatibilité de classe II et la protéine B7.2 (Wallace *et al.*, 2003). Plus tard, une autre étude a montré que la translocation bactérienne de l'intestin aux ganglions lymphatiques mésentériques et à la glande mammaire se sont produits en fin de grossesse et de lactation chez la souris. Ces cellules mononuclées du sang périphérique ont montré une plus grande diversité chez les sujets gravides que celles obtenues à partir de sujets témoins. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les bactéries et les composants bactériens d'origine intestinale sont transportés vers le sein en lactation dans les cellules mononuclées (Azagra-Boronat *et al.*, 2020).

1.2 Colonisation par exposition externe

Chez l'Homme

Les bactéries présentes dans le lait sont également susceptibles de provenir d'une contamination externe par exposition au microbiote environnant lors de l'allaitement. Chez l'Homme, on a longtemps considéré que le microbiote mammaire résultait d'une contamination externe par la peau de la mère ou la cavité buccale du nourrisson.

Cependant, de nombreuses différences sont à noter entre la composition de la communauté bactérienne mammaire et cutanée chez la femme, il a été découvert des bifidobactéries et des lactobacilles non présents dans le microbiote cutané du sein. De plus il convient de souligner que bien que les staphylocoques, les corynébactéries et les propionibactéries aient été traditionnellement associés à la peau, ils sont répandus dans la plupart, sinon la totalité, des surfaces muqueuses humaines ; en effet, les populations de ces groupes bactériens atteignent leurs concentrations les plus élevées dans les couches muqueuses des voies digestives et génito-urinaires (Cabrera-Rubio *et al.*, 2012; Rodríguez, 2014).

Le microbiome entre les localisations du corps constitue un réseau dynamique, la possibilité que la bouche du nourrisson ou la peau de la mère puissent fournir des bactéries est compatible avec la physiologie (Figure 11)(Rodríguez, 2014). En effet la bouche du nourrisson peut contaminer le lait en raison du retour du lait dans les canaux mammaires. Cela n'explique pas en revanche pourquoi le colostrum sécrété contient déjà un microbiome très similaire à celui du lait maternel (Martín *et al.*, 2003).

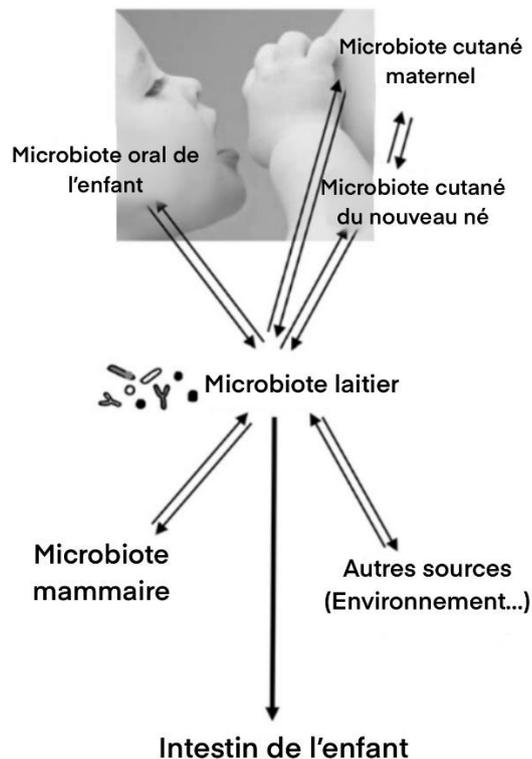


Figure 11 : interaction du microbiote mammaire avec le microbiote salivaire du nourrisson (d'après Rodriguez, 2014)

Des recherches sur le microbiote de la salive du nourrisson ont montré que des espèces de *Streptococcus* sont très présentes. Celles-ci font partie des phylotypes les plus abondants dans les échantillons de colostrum et de lait (Jost et al., 2013). De même, les staphylocoques, corynebactéries et propionibactéries sont également fréquents dans le lait maternel et se retrouvent sur la peau adulte humaine, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle les bactéries du lait maternel influencent les bactéries salivaires du nourrisson et *vice versa*, et que des interactions avec le microbiote cutané sont possibles (Rodríguez, 2014).

Cependant, une comparaison des communautés bactériennes détectées dans le lait à celles de la peau trouvée sur le sein indique que bien que les deux communautés partagent certains phylotypes, des différences majeures existent également (Rodríguez, 2014). Ces différences pertinentes entre les deux communautés indiquent que les communautés bactériennes dans le lait ne sont pas simplement le résultat d'une contamination cutanée. Le prélèvement de lait maternel pour analyse microbiologique doit tenir compte du fait que la contamination cutanée est quasiment inévitable et que, logiquement, des doutes sur la localisation d'origine (glande mammaire interne ou peau) des bactéries isolées peuvent surgir. Cependant, des études indépendantes ont montré que les lactobacilles ou les bifidobactéries ne pouvaient pas être isolés à partir d'écouvillons de peau de sein obtenus auprès de femmes qui ont fourni des échantillons de lait à partir desquels ces bactéries ont été identifiées (Martín *et al.*, 2003).

Chez les bovins

Des observations ont été faites concernant le microbiote mammaire bovin, comparé à celui de la peau des trayons (Doyle *et al.*, 2017). La présence de certaines bactéries présentes dans la cavité buccale du veau se retrouve également dans le microbiote mammaire (Murphy *et al.*, 2017). Il est donc possible qu'il existe lors de la traite ou l'allaitement un flux rétrograde de bactéries colonisant les trayons puis la mamelle.

Les genres *Propionibacterium sp.*, *Staphylococcus sp* et *Corynebacterium sp.*, ont été découverts dans le lait maternel bovin lors des études mentionnées ci-dessus. Ce sont des genres habituellement retrouvés dans l'écosystème cutané de la vache. (Lima *et al.*, 2017; Oikonomou *et al.*, 2020)

II- Epithélium mammaire non muqueux

Comme nous l'avons vu dans l'avant-propos, tous les microbiotes établis à l'heure actuelle, sont dans un mucus à la surface de leur épithélium. Nous pouvons donc alors nous demander si le lait peut remplir le rôle de mucus et déterminer si le microbiote potentiel se trouve sur la surface épithéliale ou est libre dans le lait. A ce jour, aucune étude n'a élucidé la question. Nous pouvons alors nous interroger si ce potentiel microbiote est bien présent dans la mamelle, et s'il est aussi fonctionnel que ceux déjà établis.

Il reste également à évaluer si les bactéries présentes à l'intérieur de la glande mammaire ou dans le trayon ou encore dans le lait directement peuvent interagir avec les cellules hôtes et influencer la santé de la glande mammaire. Des expériences *in vitro* d'interactions entre des bactéries (principalement des agents pathogènes) et des cellules épithéliales de la glande mammaire bovine suggèrent que même de très faibles concentrations de bactéries au-dessus de la monocouche cellulaire peuvent induire une réponse immunitaire des cellules (Roussel *et al.*, 2015). Nous pouvons donc en conclure que si le microbiote est bien présent, il est possible qu'il interagisse avec les cellules épithéliales, notamment au niveau de la réponse immunitaire et donc aider à la protection de son hôte.

III- Prophylaxie actuelle : repose sur une idée « stérile » de la mamelle

Le concept du microbiote mammaire a été développé au cours de la dernière décennie par certaines équipes de chercheurs travaillant sur la mammite chez la femme qui allaite (Martín *et al.*, 2003). Ce concept a remis en cause l'idée reçue de la stérilité mammaire. Cette idée a d'ailleurs été formalisée dans un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization, 2000).

Dans ce rapport, il a été considéré que des bactéries sont souvent présentes dans le lait de seins asymptomatiques, avec un spectre bactérien très similaire à celui trouvé sur la peau, y compris les staphylocoques et les streptocoques. Il est à noter que malgré des techniques soignées pour la collecte, seuls 50% des prélèvements sont stériles, tandis que d'autres montrent la présence de colonies développées à partir de contaminations.

Si les résultats des études présentées précédemment sont justes et applicables chez les bovins, il faudrait alors complètement revoir la protection actuelle contre les mammites, car elle repose aujourd'hui sur le postulat de la stérilité mammaire, en utilisant des antibiotiques parfois systématiquement au tarissement et en utilisant une méthode la plus aseptique possible (utilisation

de désinfectants importante) lors de la récolte laitière. De nombreuses études ont démontré que les bactéries sont courantes dans le lait des ruminants en bonne santé. Mais elles étaient considérées comme cause potentielle de mammites ou comme menace potentielle pour la santé humaine, en raison du transfert potentiel de bactéries pathogènes.

Partie IV- conséquences et perspectives

I- Conséquences sur les connaissances de la pathogénie des mammites

Au vu des résultats des différentes études analysées précédemment, nous pouvons nous demander si une possible dysbiose de ce microbiote jouerait un rôle dans les affections de la mamelle, et plus précisément des mammites bactériennes.

Le profil microbien des échantillons de lait provenant de quartiers sains n'est pas toujours cohérent parmi les études sur le microbiote mammaire bovin. Cependant elles ont constaté une association entre mammite et microbiote « dysbiotique ». En effet, l'analyse des différences de composition microbienne, de leur concentration ainsi que de leur uniformité a montré une différence importante entre les quartiers inflammés et les quartiers sains. Par exemple, une dysbiose bactérienne a été décrite chez des femmes allaitantes souffrant de douleurs mammaires et/ou de mammite (Jiménez *et al.*, 2008 ; Jiménez *et al.*, 2015 ; Maldonado-Lobón *et al.*, 2015 ; Mediano *et al.*, 2017). Dans les cas de mammite, le microbiote du lait reflète une perte de diversité bactérienne et une forte augmentation de l'abondance des séquences liées aux agents étiologiques présomptifs tels que *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* dans la mammite aiguë et subaiguë respectivement (Jiménez *et al.*, 2015 ; Patel *et al.*, 2017). De même, chez les bovins, les infections intra-mammaires cliniques et subcliniques sont associées à des changements dans le microbiote du lait (Oikonomou *et al.*, 2012, 2014 ; Kuehn *et al.*, 2013 ; Falentin *et al.*, 2016 ; Lima *et al.*, 2017). Certaines études ont rapporté une diversité bactérienne plus faible dans le lait ou les trayons affectés (Oikonomou *et al.*, 2012 ; Falentin *et al.*, 2016 ; Ganda *et al.*, 2017). La plupart des études ont été menées pour mieux comprendre l'écologie bactérienne au moment de l'infection (Oikonomou *et al.*, 2012 ; Kuehn *et al.*, 2013). Ceci est particulièrement intéressant car le ou les agents pathogènes responsables de la mammite ne sont pas identifiés par des méthodes dépendant de la culture dans de nombreux cas cliniques de mammite.

Dans l'étude de Rault *et al.* (2021), pour mieux comprendre les relations entre le microbiote des trayons et les systèmes immunitaires et réponses microbiennes, les auteurs ont utilisé le passage d'une traite biquotidienne à une traite quotidienne chez des animaux initialement sains. Les quartiers ayant une diversité et une concentration bactérienne plus élevées avaient des marqueurs d'inflammation plus précoces mais sans développer de mammite, ce qui pourrait suggérer que la composition et la concentration du microbiote jouent un rôle dans la réponse immunitaire de la glande mammaire.

Dans l'article publié en 2017 par Ganda *et al.*, l'évolution du microbiote mammaire après avoir été mis en contact avec un agent pathogène *in vivo* (souches pathogènes d'*Escherichia coli*) est étudiée. L'infection expérimentale a alors augmenté la concentration cellulaire dans le lait. Les membres de la famille des entérobactéries dominent le microbiote dans le quartier infecté, peu de temps après la mise en contact avec l'agent pathogène. La diminution du taux cellulaire dans le lait est parallèle à la diminution de la présence des entérobactéries. Cette résolution a lieu de façon spontanée, quelques jours après l'infection, et le microbiote du quartier infecté retrouve la même diversité et composition que les quartiers non infectés, que ce soit avec ou sans utilisation de traitement antibiotique, ce qui suggère une certaine résilience de l'équilibre microbiotique. (Ganda *et al.*, 2017)

On peut alors se demander si l'équilibre du présumé microbiote mammaire peut être assuré et aidé par d'autres éléments que les antibiotiques, tels que des prébiotiques ou probiotiques afin de protéger la mamelle d'infections bactériennes.

II- Conséquences des traitements antibiotiques sur le microbiote mammaire

Les études mentionnées dans le précédent paragraphe analysent les changements de la communauté microbienne lors d'une infection. Dans l'étude de Falentin *et al.* (2016), les quartiers sains ont montré une plus grande diversité microbienne que ceux ayant des antécédents de mammites lors des précédentes lactations (Falentin *et al.*, 2016). Nous pouvons dès lors nous demander si ces altérations du microbiote sont provoquées par l'infection par un agent pathogène ou l'utilisation des antibiotiques, ou si elles précèdent l'infection. Cependant, dans l'étude de Bonsaglia *et al.* (2017), il semble que les vaches ayant reçu un traitement antibiotique au tarissement et les vaches ayant reçu un simple bouchon aient un résultat similaire en termes de santé mammaire et de diversité du microbiote, en début de lactation. Il semble également que la diversité et la composition du microbiote peut changer très rapidement, car ils ont des résultats différents à un ou deux jours d'intervalle, ce qui montre un caractère dynamique du microbiote mammaire. De nouvelles études sur le retour à l'équilibre du microbiote à la suite de l'utilisation d'antibiotiques sont nécessaires pour confirmer ces découvertes.

III- Perspectives futures : nouvelles mesures de prophylaxie ?

La gestion la plus courante des mammites subcliniques utilise un antibiotique intramammaire administré au début de la période de tarissement, visant à éliminer une infection subclinique persistante ou à prévenir de nouvelles infections lors de la période à risque qu'est le tarissement. Pendant de nombreuses années, il était très courant d'utiliser ces antibiotiques sur tous les quartiers de toutes les vaches du cheptel. De nombreux pays ont depuis opté pour une approche utilisant moins d'antibiotiques, les utilisant seulement sur les vaches ayant un historique de mammite lors de la précédente lactation ou un comptage cellulaire élevé avant le tarissement, signe de mammite subclinique. Des inquiétudes ont alors été soulevées sur l'impact de cette approche sur la sélection de souches résistantes aux antibiotiques (Oliver *et al.*, 2011).

La théorie de l'axe entéro-mammaire ouvre des alternatives intéressantes à l'utilisation des probiotiques pour la santé de la mamelle. Si des probiotiques ingérés ont la capacité d'accéder à la glande mammaire par circulation sanguine, ils pourraient être utilisés pour lutter contre les agents pathogènes impliqués dans le développement de mammites. Cependant de nombreuses recherches supplémentaires sont nécessaires pour valider cette théorie et envisager cette utilisation de probiotiques.

Concernant le potentiel des probiotiques, une étude menée en humaine a administré par voie orale le probiotique VSL3 (mélange de 8 souches bactériennes) à des femmes enceintes et allaitantes, ce qui a entraîné des concentrations plus élevées dans le colostrum et le lait de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (contenu dans les probiotiques) par rapport au lot témoin ayant reçu un placebo (Mastromarino *et al.*, 2015). Cependant une autre étude a montré qu'une ingestion de lait contenant *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* n'a pas provoqué de différence significative dans la composition du microbiote (Simpson *et al.*, 2018).

Arroyo *et al.* ont montré en 2010 que l'administration orale de lactobacilles isolés du lait de femmes en bonne santé était plus efficace que l'antibiothérapie dans le traitement de mammites humaines. De plus, les bactéries chez les femmes traitées qui n'avaient pas de lactobacilles dans leur lait avant le traitement ont été colonisées par les souches de lactobacilles utilisées dans l'essai, ce qui suggère que des approches de traitement probiotiques de la mammite sont envisageables (Arroyo *et al.*, 2010).

Chez les bovins, l'administration intramammaire de lactocoques semble être aussi efficace pour éliminer les infections subcliniques chroniques qu'un traitement antibiotique (Klostermann *et al.*, 2008). Cependant, plutôt que de reconstituer l'équilibre du microbiote, certains auteurs soutiennent que cela pourrait être dû à une stimulation immunitaire permettant une réponse de la glande mammaire et l'élimination des agents d'infection intramammaire subclinique (Crispie *et al.*, 2008 ; Mignacca *et al.*, 2017). Conformément à ce concept, Pellegrino *et al.* (2017), décrivent que l'inoculation de bactéries lactiques chez les vaches en période de tarissement augmentait la quantité d'isotypes d'IgG dans le sang et le lait et ont constaté que ces anticorps étaient capables de reconnaître les épitopes de *Staphylococcus aureus*. La prolifération des lymphocytes mammaires était significativement plus élevée dans le groupe inoculé à tous les points de temps testés, après la stimulation de bactéries lactiques ou de *Staphylococcus aureus*. Les résultats ont montré que les probiotiques pouvaient être une alternative naturelle et efficace dans la prévention de la mammite bovine en période de tarissement et agir comme un immunomodulateur stimulant les lignes de défenses locales et systémiques. Cependant, une concentration cellulaire trop élevée entraîne des conséquences sur la production, les normes européennes imposant un faible taux cellulaire. Cette utilisation de probiotiques, dans ce contexte, est donc à nuancer (Pellegrino *et al.*, 2017).

En accord avec la préoccupation concernant l'antibiorésistance et de la politique *One Health*, la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques (« résistome ») dans le microbiote mammaire humain a commencé à être explorée, et suggère leur rôle dans la formation du résistome du microbiote gastro-intestinal du nourrisson (Pärnänen *et al.*, 2018). En effet, des études montrent que le lait maternel serait le vecteur du GIT des nouveaux nés (Jost *et al.*, 2015 ; Murphy *et al.*, 2017 ; Pärnänen *et al.*, 2018). En revanche, dans une étude récente sur les femmes, Simpson *et al.* (2018), ont conclu qu'il était peu probable que l'allaitement soit une source importante de ces probiotiques pour les nourrissons et donc que l'administration orale de probiotiques aux mères n'a pas d'incidence significative sur la composition globale du microbiote du nouveau-né. L'utilisation de probiotiques chez la mère pour aider la formation du GIT chez le nourrisson semble donc peu efficace pour le moment (Simpson *et al.* 2018)

De toute évidence, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre l'impact de l'administration de probiotiques sur le microbiote du lait de vache ainsi que sur le microbiote gastro-intestinal des descendants et sur leur état de santé respectif.

CONCLUSION

L'existence d'un microbiote mammaire bovin et humain a été suggérée par de récentes études. En effet les méthodes de séquençage ont montré que malgré l'absence de populations détectées par les méthodes de culture classique, de nombreux clades sont retrouvés dans le lait. Les méthodes les plus utilisées dans les études sur le microbiote mammaire bovin utilisent une PCR et un séquençage de l'ARNr 16S. Ces méthodes entraînent des biais biologiques, des erreurs lors de l'échantillonnage, des biais technologiques et des erreurs de séquençage, ce qui engendre des limites aux conclusions de ces articles.

Ces conclusions montrent cependant un microbiote d'une grande complexité du fait de sa richesse en composition et en concentration bactériennes, avec de nombreux facteurs de variabilités tels que le stade de lactation, les traits génétiques, la parité, l'alimentation, la localisation géographique, les pratiques de gestion d'élevage et d'entretien des animaux, l'hygiène de la traite et la santé de l'animal. Le microbiote semble avoir une grande capacité de régénération à la suite d'un incident qui pourrait changer sa composition tel qu'une infection ou l'utilisation d'antibiotiques.

De nombreuses théories sur la colonisation du microbiote mammaire ont émergés, la première étant celle de l'axe entéro-mammaire. Cette hypothèse repose sur la théorie d'une sélection de bactéries gastro-intestinales qui atteindraient les sécrétions mammaires via des leucocytes sanguins. Il existe également la théorie de l'exposition externe qui correspond à la colonisation du parenchyme mammaire par les bactéries de l'environnement notamment de la peau et de la bouche du nourrisson ou du veau allaités.

La prise en compte d'un tel microbiote entraîne des conséquences sur la prophylaxie actuelle des mammites. En effet pour le moment, leur prévention repose sur le postulat de la stérilité mammaire et utilise des antibiotiques parfois systématiquement au tarissement, ainsi que la méthode la plus aseptique possible lors de la récolte du lait. Or, dans certaines études, il a été montré qu'une mamelle « dysbiotique » entraînerait une inflammation voire une infection mammaire. On peut alors se demander si les traitements préventifs à base antibiotiques pourraient être remplacés par l'utilisation de prébiotiques ou probiotiques. Des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre l'impact de l'administration de probiotiques sur la santé mammaire.

ANNEXES

Annexe 1 : tableau de données de matériel et méthodes utilisées les différents articles sur l'identification du microbiote mammaire bovin sélectionnés pour les statistiques

Auteurs	Date	Extraction	type amorce	Séquençage
Albonico	2020	Power Soil Kit (MO BIO)	V3-V4	MiSeq, Illumina
Bhatt	2012	DNA Mini Kit (QIAGEN)	0	Métagénomique
Bonsaglia	2017	Power Soil Kit (MO BIO)	V4	MiSeq, Illumina
Catozzi (a)	2019	Power Soil Kit (QIAGEN)	V4	Ion Torrent
Catozzi (b)	2019	Power Soil Kit (QIAGEN)	V4	Ion Torrent
Catozzi (c)	2017	Power Soil Kit (QIAGEN)	V1-V2	Ion Torrent
Dahlberg	2019	Power Soil Kit (MO BIO)	V3-V4	MiSeq, Illumina
Derakhshani	2018	Fungal/Bacterial DNA Kit (ZYMO)	V1-V2	MiSeq, Illumina
Doyle	2017	Power Soil Kit (QIAGEN)	V3-V4	MiSeq, Illumina
Falentin	2016	DNA Mini Kit (QIAGEN)	V3-V4	Pyroséquençage
Ganda (a)	2017	Power Soil Kit (MO BIO)	V4	MiSeq, Illumina
Ganda (b)	2016	Power Soil Kit (MO BIO)	V4	MiSeq, Illumina
Hoque	2019	PowerClean (QIAGEN)	0	Métagénomique
Kuehn	2013	DNA Mini Kit (QIAGEN)	V1-V2	Pyroséquençage
Li	2017	Power Soil Kit (MO BIO)	V1-V3	MiSeq, Illumina
Lima	2017	Power Soil Kit (MO BIO)	V4	MiSeq, Illumina
Lima	2018	Power Soil Kit (MO BIO)	V4	MiSeq, Illumina
Metzger (a)	2018	DNA Mini Kit (QIAGEN)	V4	MiSeq, Illumina
Metzger (b)	2018	DNA Mini Kit (QIAGEN)	V4	MiSeq, Illumina
Oikonomou (a)	2014	DNA Mini Kit (QIAGEN)	V1-V2	Pyroséquençage
Oikonomou (b)	2012	DNA Mini Kit (QIAGEN)	V1-V2	Pyroséquençage
Porcellato (a)	2020	Power Food (MO BIO)	V3-V4	MiSeq, Illumina
Porcellato (b)	2018	UltraClean GelSpin Kit (MO BIO)	V3-V4	MiSeq, Illumina
Porcellato (c)	2016	UltraClean GelSpin Kit (MO BIO)	V3-V4	MiSeq, Illumina
Quigley (a)	2013	Power Food (MO BIO)	V4	Pyroséquençage
Quigley (b)	2012	Power Food (MO BIO)	V4	Pyroséquençage
Skeie	2019	Mag Midi kit (LGC)	V3-V4	MiSeq, Illumina
Taponem	2019	Power Food (MO BIO)	V3-V4	MiSeq, Illumina
Tong	2019	Power Soil Kit (QIAGEN)	V1-V2	MiSeq, Illumina

BIBLIOGRAPHIE

- Addis, M. F., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R. C., & Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from -omics studies. *Molecular BioSystems*, *12*(8), 2359–2372. <https://doi.org/10.1039/c6mb00217j>
- Aird, D., Ross, M. G., Chen, W. S., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, D. B., Nusbaum, C., & Gnirke, A. (2011). Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biology*, *12*(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-2-r18>
- Albanese, D., Fontana, P., De Filippo, C., Cavalieri, D., & Donati, C. (2015). MICCA: A complete and accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. *Scientific Reports*, *5*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep09743>
- Albonico, F., Barelli, C., Albanese, D., Manica, M., Partel, E., Rosso, F., Ripellino, S., Pindo, M., Donati, C., Zecconi, A., Mortarino, M., & Hauffe, H. C. (2020). Raw milk and fecal microbiota of commercial alpine dairy cows varies with herd, fat content and diet. *PLoS ONE*, *15*(8 August), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237262>
- Alipour, M. J., Jalanka, J., Pessa-Morikawa, T., Kokkonen, T., Satokari, R., Hynönen, U., Iivanainen, A., & Niku, M. (2018). The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28733-y>
- Arroyo, R., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2010). Treatment of infectious mastitis during lactation: Antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases*, *50*(12), 1551–1558. <https://doi.org/10.1086/652763>
- Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J., & Weightman, A. J. (2005). At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 7724–7736. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7724-7736.2005>
- Avershina, E., Angell, I. L., Simpson, M., Storrø, O., Øien, T., Johnsen, R., & Rudi, K. (2018). Low maternal microbiota sharing across gut, breast milk and vagina, as revealed by 16s rRNA gene and reduced metagenomic sequencing. *Genes*, *9*(5). <https://doi.org/10.3390/genes9050231>
- Azagra-Boronat, I., Tres, A., Massot-Cladera, M., Franch, À., Castell, M., Guardiola, F., Pérez-Cano, F. J., & Rodríguez-Lagunas, M. J. (2020). Lactobacillus fermentum CECT5716 supplementation in rats during pregnancy and lactation affects mammary milk composition. *Journal of Dairy Science*, *103*(4), 2982–2992. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17384>
- Bachy, C., Dolan, J. R., López-García, P., Deschamps, P., & Moreira, D. (2013). Accuracy of protist diversity assessments: Morphology compared with cloning and direct pyrosequencing of 18S rRNA genes and ITS regions using the conspicuous tintinnid ciliates as a case study. *ISME Journal*, *7*(2), 244–255. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.106>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Gou, Y. K., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(44), 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>

- Beasley, S. S., & Saris, P. E. J. (2004). Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(8), 5051–5053. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.5051-5053.2004>
- Bhatt, V. D., Ahir, V. B., Koringa, P. G., Jakhesara, S. J., Rank, D. N., Nauriyal, D. S., Kunjadia, A. P., & Joshi, C. G. (2012). Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. *Journal of Applied Microbiology*, *112*(4), 639–650. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05244.x>
- Boix-Amorós, A., Collado, M. C., & Mira, A. (2016). Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Frontiers in Microbiology*, *7*(APR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00492>
- Bonizzi, I., Buffoni, J. N., Feligini, M., & Enne, G. (2009). Investigating the relationship between raw milk bacterial composition, as described by intergenic transcribed spacer-PCR fingerprinting, and pasture altitude. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(4), 1319–1329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04311.x>
- Bonsaglia, E. C. R., Gomes, M. S., Canisso, I. F., Zhou, Z., Lima, S. F., Rall, V. L. M., Oikonomou, G., Bicalho, R. C., & Lima, F. S. (2017). Milk microbiome and bacterial load following dry cow therapy without antibiotics in dairy cows with healthy mammary gland. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08790-5>
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M. C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., & Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *American Journal of Clinical Nutrition*, *96*(3), 544–551.
- Carafa, I., Navarro, I. C., Bittante, G., Tagliapietra, F., Gallo, L., Tuohy, K., & Franciosi, E. (2020). Shift in the cow milk microbiota during alpine pasture as analyzed by culture dependent and high-throughput sequencing techniques. *Food Microbiology*, *91*(February), 103504. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103504>
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(1), 278–288. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>
- Catozzi, C., Cuscó, A., Lecchi, C., Talenti, A., Martucciello, A., Cappelli, G., Bonastre, A. S., Francino, O., & Ceciliani, F. (2019). Short communication: Intra- and inter-individual milk microbiota variability in healthy and infected water buffalo udder quarters. *Journal of Dairy Science*, *102*(8), 7476–7482. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16352>
- Cebra, J. J. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *American Journal of Clinical Nutrition*, *69*(5), 1046S-1051S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.5.1046s>
- Cline, J., Braman, J. C., & Hogrefe, H. H. (1996). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, *24*(18), 3546–3551.
- Crispie, F., Alonso-Gómez, M., O'Loughlin, C., Klostermann, K., Flynn, J., Arkins, S., Meaney, W., Paul Ross, R., & Hill, C. (2008). Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: Effect of live lactococci on the mammary immune response. *Journal of Dairy Research*, *75*(3), 374–384. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003385>
- De Andrés, J., Jiménez, E., Chico-Calero, I., Fresno, M., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2018).

Physiological translocation of lactic acid bacteria during pregnancy contributes to the composition of the milk microbiota in mice. *Nutrients*, *10*(1).
<https://doi.org/10.3390/nu10010014>

- Derakhshani, H., Fehr, K. B., Sepehri, S., Francoz, D., Buck, J. De, Barkema, H. W., Plaizier, J. C., & Khafipour, E. (2018). Invited review : Microbiota of the bovine udder : Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of Dairy Science*, *101*(12), 10605–10625.
- Derakhshani, H., Plaizier, J. C., Buck, J. De, Barkema, H. W., & Khafipour, E. (2018). Composition of the teat canal and intramammary microbiota of dairy cows subjected to antimicrobial dry cow therapy and internal teat sealant. *Journal of Dairy Science*, 1–15.
- Donnet-Hughes, A., Perez, P. F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., & Schiffrin, E. J. (2010). Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proceedings of the Nutrition Society*, *69*(3), 407–415.
<https://doi.org/10.1017/S0029665110001898>
- Dosogne, H., Vangroenweghe, F., Mehrzad, J., Massart-Leën, A. M., & Burvenich, C. (2003). Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. *Journal of Dairy Science*, *86*(3), 828–834. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73665-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73665-0)
- Doyle, C. J., Gleeson, D., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2017). Impacts of seasonal housing and teat preparation on raw milk microbiota: A high-throughput sequencing study. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(2), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AEM.02694-16>
- Erkus, O., de Jager, V. C. L., Geene, R. T. C. M., van Alen-Boerrigter, I., Hazelwood, L., van Hijum, S. A. F. T., Kleerebezem, M., & Smid, E. J. (2016). Use of propidium monoazide for selective profiling of viable microbial cells during Gouda cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, *228*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.027>
- Falentin, H., Rault, L., Nicolas, A., Bouchard, D. S., Lassalas, J., Lambertson, P., Aubry, J. M., Marnet, P. G., Le Loir, Y., & Even, S. (2016). Bovine teat microbiome analysis revealed reduced alpha diversity and significant changes in taxonomic profiles in quarters with a history of mastitis. *Frontiers in Microbiology*, *7*(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00480>
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., & Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, *69*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.001>
- Ganda, E. K., Bisinotto, R. S., Lima, S. F., Kronauer, K., Decter, D. H., Oikonomou, G., Schukken, Y. H., & Bicalho, R. C. (2016). Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. *Scientific Reports*, *6*(June), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep37565>
- Ganda, E. K., Gaeta, N., Sipka, A., Pomeroy, B., Oikonomou, G., Schukken, Y. H., & Bicalho, R. C. (2017). Normal milk microbiome is reestablished following experimental infection with *Escherichia coli* independent of intramammary antibiotic treatment with a third-generation cephalosporin in bovines. 1–17.
- Glassing, A., Dowd, S. E., Galandiuk, S., Davis, B., & Chiodini, R. J. (2016). Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota

in low bacterial biomass samples. *Gut Pathogens*, 8(1), 1–12.

- Goldman, A. S., Goldblum R. M., (1997). Transfer of Maternal Leukocytes to the Infant by Human Milk. *Current Topics in Microbiology and Immunology (MICROBIOLOGY, volume 222)*
- Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Murray, P. R., Green, E. D., Turner, M. L., & Segre, J. A. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 324(5931), 1190–1192. <https://doi.org/10.1126/science.1171700>
- Grunberg, B., Ducrotté, P., Létard, J.-C., Costil, V., Dalbiès, P.-A., & Commission de nutrition du CREGG. (2015). Microbiote intestinal, un organe vital, à découvrir. *Hegel*, N° 4(4), 313. <https://doi.org/10.4267/2042/57921>
- Gryaznova, M. V., Syromyatnikov, M. Y., Dvoretzkaya, Y. D., Solodskikh, S. A., Klimov, N. T., Mikhalev, V. I., Zimnikov, V. I., Mikhaylov, E. V., & Popov, V. N. (2021). Microbiota of cow's milk with udder pathologies. *Microorganisms*, 9(9), 1–11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091974>
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T. Z., Petrosino, J. F., Knight, R., & Birren, B. W. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, 21(3), 494–504.
- Harp, J. A., Runnels, P. L., & Pesch, B. A. (1988). Lymphocyte recirculation in cattle: Patterns of localization by mammary and mesenteric lymph node lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 20(1), 31–39. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(88\)90023-2](https://doi.org/10.1016/0165-2427(88)90023-2)
- Heikkilä, M. P., & Saris, P. E. J. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 471–478. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02002.x>
- Hoque, M. N., Istiaq, A., Clement, R. A., Sultana, M., Crandall, K. A., Siddiki, A. Z., & Hossain, M. A. (2019). Metagenomic deep sequencing reveals association of microbiome signature with functional biases in bovine mastitis. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49468-4>
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., ... White, O. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J., & Rodríguez, J. M. (2008). Oral Administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4650–4655. <https://doi.org/10.1128/AEM.02599-07>
- Jiménez, Esther, De Andrés, J., Manrique, M., Pareja-Tobes, P., Tobes, R., Martínez-Blanch, J. F., Codoñer, F. M., Ramón, D., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2015). Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women. *Journal of Human Lactation*, 31(3), 406–415. <https://doi.org/10.1177/0890334415585078>

- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., & Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *British Journal of Nutrition*, *110*(7), 1253–1262. <https://doi.org/10.1017/S0007114513000597>
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., & Chassard, C. (2015). Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutrition Reviews*, *73*(7), 426–437. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu016>
- Khodayar-Pardo, P., Mira-Pascual, L., Collado, M. C., & Martínez-Costa, C. (2014). Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *Journal of Perinatology*, *34*(8), 599–605.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*(PART 2), 346–351.
- Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Ross, R. P., Hill, C., & Meaney, W. (2008). Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: Comparison with antibiotic treatment in field trials. *Journal of Dairy Research*, *75*(3), 365–373. <https://doi.org/10.1017/S0022029908003373>
- Knudsen, B. E., Bergmark, L., Munk, P., Lukjancenko, O., Priemé, A., Aarestrup, F. M., & Pamp, S. J. (2016). Impact of Sample Type and DNA Isolation Procedure on Genomic Inference of Microbiome Composition. *MSystems*, *1*(5), 1–15.
- Kuehn, J. S., Gorden, P. J., Munro, D., Rong, R., Dong, Q., Plummer, P. J., Wang, C., & Phillips, G. J. (2013). Bacterial Community Profiling of Milk Samples as a Means to Understand Culture-Negative Bovine Clinical Mastitis. *PLoS ONE*, *8*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061959>
- Kumar, H., du Toit, E., Kulkarni, A., Aakko, J., Linderborg, K. M., Zhang, Y., Nicol, M. P., Isolauri, E., Yang, B., Collado, M. C., & Salminen, S. (2016). Distinct patterns in human milk microbiota and fatty acid profiles across specific geographic locations. *Frontiers in Microbiology*, *7*(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01619>
- Li, Z., Wright, A. D. G., Yang, Y., Si, H., & Li, G. (2017). Unique bacteria community composition and co-occurrence in the milk of different ruminants. *Scientific Reports*, *7*, 1–9.
- Lima, S. F., Teixeira, A. G. V., Lima, F. S., Ganda, E. K., Higgins, C. H., Oikonomou, G., & Bicalho, R. C. (2017). The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, *100*(4), 3031–3042. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11604>
- Ma, T., Shen, L., Wen, Q., Lv, R., Hou, Q., Kwok, L. Y., Sun, Z., & Zhang, H. (2021). Pacbio sequencing revealed variation in the microbiota diversity, species richness and composition between milk collected from healthy and mastitis cows. *Microbiology (United Kingdom)*, *167*(7). <https://doi.org/10.1099/mic.0.000968>

- Maldonado-Lobón, J. A., Díaz-López, M. A., Carputo, R., Duarte, P., Díaz-Ropero, M. P., Valero, A. D., Sañudo, A., Sempere, L., Ruiz-López, M. D., Bañuelos, Ó., Fonollá, J., & Martín, M. O. (2015). Lactobacillus fermentum CECT 5716 Reduces Staphylococcus Load in the Breastmilk of Lactating Mothers Suffering Breast Pain: A Randomized Controlled Trial. *Breastfeeding Medicine*, 10(9), 425–432. <https://doi.org/10.1089/bfm.2015.0070>
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*, 143(6), 754–758. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.09.028>
- Mastromarino, P., Capobianco, D., Miccheli, A., Praticò, G., Campagna, G., Laforgia, N., Capursi, T., & Baldassarre, M. E. (2015). Administration of a multistrain probiotic product (VSL#3) to women in the perinatal period differentially affects breast milk beneficial microbiota in relation to mode of delivery. *Pharmacological Research*, 95–96, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.03.013>
- Mathys, V., Lefèvre, P., Fontaine, V., Dehem, M., Donnio, P. Y., Février, F., Le Coustumier, A., & Bifani, P. (2007). La PCR en temps réel: Principe et application en infectiologie. *Antibiotiques*, 9(3), 205–211.
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., & Rescigno, M. (2014). Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells. *Immunity*, 40(2), 248–261. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.012>
- Mediano, P., Fernández, L., Jiménez, E., Arroyo, R., Espinosa-Martos, I., Rodríguez, J. M., & Marín, M. (2017). Microbial Diversity in Milk of Women with Mastitis: Potential Role of Coagulase-Negative Staphylococci, Viridans Group Streptococci, and Corynebacteria. *Journal of Human Lactation*, 33(2), 309–318. <https://doi.org/10.1177/0890334417692968>
- Metzger, S. A., Hernandez, L. L., Skarlupka, J. H., Suen, G., Walker, T. M., & Ruegg, P. L. (2018). Influence of sampling technique and bedding type on the milk microbiota : Results of a pilot study. *Journal of Dairy Science*, 101(7), 6346–6356.
- Mignacca, S. A., Dore, S., Spuria, L., Zanghì, P., Amato, B., Duprè, I., Armas, F., Biasibetti, E., Camperio, C., Lollai, S. A., Capucchio, M. T., Cannas, E. A., Lo Presti, V. di M., & Marianelli, C. (2017). Intramammary infusion of a live culture of Lactococcus lactis in ewes to treat staphylococcal mastitis. *Journal of Medical Microbiology*, 66(12), 1798–1810. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000641>
- Miller, R. H., Paape, M. J., & Fulton, L. A. (1991). Variation in Milk Somatic Cells of Heifers at First Calving. *Journal of Dairy Science*, 74(11), 3782–3790. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78570-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78570-6)
- Murphy, K., Curley, D., O'callaghan, T. F., O'shea, C. A., Dempsey, E. M., O'toole, P. W., Ross, R. P., Ryan, C. A., & Stanton, C. (2017). The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. *Scientific Reports*, 7(July 2016), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep40597>
- Nelson, M. C., Morrison, H. G., Benjamino, J., Grim, S. L., & Graf, J. (2014). Analysis, optimization and verification of illumina-generated 16s rRNA gene amplicon surveys. *PLoS ONE*, 9(4).
- Nicola, I., Cerutti, F., Grego, E., Bertone, I., Gianella, P., D'Angelo, A., Peletto, S., & Bellino, C.

- (2017). Characterization of the upper and lower respiratory tract microbiota in Piedmontese calves. *Microbiome*, 5(1), 152. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0372-5>
- Oikonomou, G., Addis, M. F., Chassard, C., Nader-Macias, M. E. F., Grant, I., Delbès, C., Bogni, C. I., Le Loir, Y., & Even, S. (2020). Milk Microbiota: What Are We Exactly Talking About? *Frontiers in Microbiology*, 11(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00060>
- Oikonomou, G., Bicalho, M. L., Meira, E., Rossi, R. E., Foditsch, C., Machado, V. S., Teixeira, A. G. V., Santisteban, C., Schukken, Y. H., & Bicalho, R. C. (2014). Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PLoS ONE*, 9(1). 1-11 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085904>
- Oikonomou, G., Machado, V. S., Santisteban, C., Schukken, Y. H., & Bicalho, R. C. (2012). Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16s rDNA. *PLoS ONE*, 7(10). 1-14 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047671>
- Oliver S.P., Murinda S., Jayarao B.M., (2011), Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne Pathogene Disease Vol.8 No.3. 2011 Mar;8(3):37-55.*
- Olson, N. D., Treangen, T. J., Hill, C. M., Cepeda-Espinoza, V., Ghurye, J., Koren, S., & Pop, M. (2018). Metagenomic assembly through the lens of validation: Recent advances in assessing and improving the quality of genomes assembled from metagenomes. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1140–1150.
- Pärnänen, K., Karkman, A., Hultman, J., Lyra, C., Bengtsson-Palme, J., Larsson, D. G. J., Rautava, S., Isolauri, E., Salminen, S., Kumar, H., Satokari, R., & Virta, M. (2018). Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nature Communications*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06393-w>
- Patel, S. H., Vaidya, Y. H., Patel, R. J., Pandit, R. J., Joshi, C. G., & Kunjadiya, A. P. (2017). Culture independent assessment of human milk microbial community in lactational mastitis. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08451-7>
- Pellegrino, M., Berardo, N., Giraud, J., Nader-Macías, M. E. F., & Bogni, C. (2017). Bovine mastitis prevention: Humoral and cellular response of dairy cows inoculated with lactic acid bacteria at the dry-off period. *Beneficial Microbes*, 8(4), 589–596. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0194>
- Perez, P. F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E. J., & Donnet-Hughes, A. (2007). Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119(3). <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1649>
- Pernin-Grandjean, J. (2019). *Mise au point d'une méthode de séquençage de nouvelle génération pour le diagnostic génétique de la déficience intellectuelle.*
- Pirard, B., Crèvecoeur, S., Fall, P. A., Lausberg, P., Taminiau, B., & Daube, G. (2021). Potential resident bacterial microbiota in udder tissues of culled cows sampled in abattoir. *Research in Veterinary Science*, 136(April 2020), 369–372. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.03.012>
- Poutrel, B., & Rainard, P. (2017). *Le microbiote de la glande mammaire bovine : mythe ou réalité ?* No 373 327-332

- Rault, L., Le Loir, Y., & Even, S. (2021). *The bovine mammary gland microbiota as a resource for the design of new strategies against mastitis*. <https://hal.inrae.fr/hal-03239152>
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2(4), 361–367.
- Rintala, A., Pietilä, S., Munukka, E., Eerola, E., Pursiheimo, J. P., Laiho, A., Pekkala, S., & Huovinen, P. (2017). Gut microbiota analysis results are highly dependent on the 16s rRNA gene target region, whereas the impact of DNA extraction is minor. *Journal of Biomolecular Techniques*, 28(1), 19–30. <https://doi.org/10.7171/jbt.17-2801-003>
- Riollet, C., Rainard, P., & Poutrel, B. (2000). Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(2), 161–167. <https://doi.org/10.1128/CDLI.7.2.161-167.2000>
- Rodríguez, J. M. (2014). The Origin of Human Milk Bacteria : Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late. *American Society for Nutrition. Adv. Nutr.*, 5, 779–784. <https://doi.org/10.3945/an.114.007229.FIGURE>
- Roussel, P., Cunha, P., Porcherie, A., Petzl, W., Gilbert, F. B., Riollet, C., Zerbe, H., Rainard, P., & Germon, P. (2015). Investigating the contribution of IL-17A and IL-17F to the host response during *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Research*, 46(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0201-4>
- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. J., & Walker, A. W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*, 12(1), 1–12.
- Sanger F., Barrel B. G., Coulson A.R., Fiddes J.C., Hutchison III C.A., Slocombe M. S. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phiX174 DNA. *Nature*, 265, 687–695.
- Sanschagrín, S., & Yergeau, E. (2014). Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. *Journal of Visualized Experiments*, 90, 1–7.
- Schloss, P. D., Gevers, D., & Westcott, S. L. (2011). Reducing the effects of PCR amplification and sequencing Artifacts on 16s rRNA-based studies. *PLoS ONE*, 6(12). 1-14
- Sérieyes F. Modification de la morphologie et de la physiologie de la mamelle, in: Le tarissement des vaches laitières: une période-clé pour la santé, la production et la rentabilité du troupeau. 1997,. France Agricole Editions, 31-37.
- Shin, S. K., Kim, J., Ha, S. M., Oh, H. S., Chun, J., Sohn, J., & Yi, H. (2015). Metagenomic insights into the bioaerosols in the indoor and outdoor environments of childcare facilities. *PLoS ONE*, 10(5), 1–17.
- Simpson, M. R., Avershina, E., Storrø, O., Johnsen, R., Rudi, K., & Øien, T. (2018). Breastfeeding-associated microbiota in human milk following supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* La-5, and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 889–899. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13411>

- Smirnov, K. S., Maier, T. V., Walker, A., Heinzmann, S. S., Forcisi, S., Martinez, I., et al. (2016). Challenges of metabolomics in human gut microbiota research. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 266–279
- Somma, M. (2003). Extraction et purification de l'ADN. *Analyse d'échantillons Alimentaires Pour La Présence d'organismes Génétiquement Modifiés, Module 4.* 1- 19
- Tong, J., Zhang, H., Zhang, Y., Xiong, B., & Jiang, L. (2019). Microbiome and Metabolome Analyses of Milk From Dairy Cows With Subclinical *Streptococcus agalactiae* Mastitis—Potential Biomarkers. *Frontiers in Microbiology*, 10(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02547>
- Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., Kirton, E. S., He, S., Woyke, T., Lee, J., Chen, F., Dangl, J. L., & Tringe, S. G. (2015). Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00771>
- Urbaniak, C., Angelini, M., Gloor, G. B., & Reid, G. (2016). Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome*, 4, 1–9.
- Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS ONE*, 8(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>
- Wallace, T. D., Bradley, S., Buckley, N. D., & Green-Johnson, J. M. (2003). Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection*, 66(3), 466–472.
- Weisz-Carrington P., Roux M.E., McWilliams M., Phillips-Quagliata J. M., Lamm M. E. (1979) Organ and Isotype Distribution of Plasma Cells Producing Specific Antibody after Oral Immunization: Evidence for A Generalized Secretory Immune System. *Journal of Immunology* 123 (4): 1705–1708.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- World Health Organization. (2000). Mastitis - Causes and Management. *World Health Organization*, 1–44.
- Young W., Hine B., Wallace O., Callaghan M., Bibiloni R., (2015). Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. *PeerJ*. 2015. 10.7717/peerj.888. 1-21
- Zened A., Forano, E., Delbes, C., Verdier-Metz, I., Morgavi, D., Popova, M., Ramayo-Caldas, Y., Bergonier D., Meynadier A., Marie-Etancelin C. (2021). Les microbiotes des ruminants : état des lieux de la recherche et impacts des microbiotes sur les performances et la santé des animaux. *Inrae productions animales* 33-4-4597. 249-260.

Résumé :

L'existence d'un microbiote mammaire a été suggérée par de récentes études et leurs résultats fait débat. En effet les nouvelles méthodes de séquençage montrent une présence de population bactérienne dans le lait alors que la mamelle était jusqu'ici considérée comme stérile. Notre travail de thèse est un état des lieux bibliographique sur le microbiote mammaire bovin. Notre travail étudie les méthodes utilisées dans les différentes études sur le sujet et les compare. En effet de nombreux biais ont remis en cause les résultats de ces études. Nous étudions également les résultats de ces études, qui nous montrent un microbiote complexe, avec une grande richesse en composition et concentration de bactéries. Les résultats montrent également de nombreux facteurs de variations individuelles. Nous nous interrogeons également sur la voie de la colonisation de la mamelle, en ce sens nous étudions l'axe entero-mammaire et la colonisation externe. Aucune des voies n'est clairement établie aujourd'hui, des études complémentaires sont nécessaires. Les résultats de ces études entraînent également de nombreuses questions sur la prophylaxie actuelle utilisée contre les mammites, ainsi que sur l'utilisation de probiotiques pour la santé de la mamelle. Ici encore, de nouvelles études sont nécessaires afin d'élucider la question des probiotiques.

En conclusion, la présence d'un microbiote mammaire bovin semble établie, mais de nombreuses études complémentaires sont nécessaire afin de comprendre le fonctionnement et l'impact de cette découverte.

Mots clés : microbiote – glande mammaire – bovins – étude bibliographique