

Comment améliorer la qualité sanitaire des fourrages pour réduire les pathologies respiratoires équine ?

V. Séguin¹, D. Garon¹, S. Lemauviel-Lavenant², Y. Gallard³, A. Ourry²

Les poussières, moisissures, pollens et endotoxines présents dans les fourrages sont suspectés d'être les principaux agents étiologiques des maladies pulmonaires équine. L'étude ici présentée ouvre des perspectives pour améliorer la qualité sanitaire des foins distribués aux équins et ainsi réduire la prévalence de ces maladies.

RÉSUMÉ

Une expérimentation, menée à partir du fourrage d'une prairie permanente bas-normande, a mis en évidence que certaines pratiques culturales (foin bottelé à 75 % MS) ou une pluie après la coupe entraînent une augmentation des poussières respirables et des organismes fongiques, en particulier des espèces toxigènes comme *Aspergillus fumigatus*. A l'inverse, d'autres pratiques limitent ces aérosols : le séchage en grange, l'enrubannage et l'ajout d'acide propionique lorsque les conditions météorologiques ne permettent pas de récolter le foin à 85 % MS. L'analyse de fourrages monospécifiques ou commercialisés pour l'alimentation équine suggère que le choix de la composition floristique d'une prairie semée pourrait aussi constituer une voie d'amélioration.

SUMMARY

Improving the safety of forage in order to reduce respiratory disease in horses

Dust, moulds, pollen and endotoxins occurring in forage are considered to be among the main etiological agents of equine pulmonary disease. An experiment based on forage harvested from permanent grassland in Lower Normandy showed that certain cultivation practices (baling hay with 75 % dry matter content) or even rain after cutting increase the amount of dust and fungal spores (mainly toxigenic fungus such as *Aspergillus fumigatus*) breathed in by horses. Alternatively, barn drying, haylage and propionic acid used as a preservative help control dust and mould when weather conditions prevent harvesting hay with 85 % dry matter content. The analysis of single-species and commercial forage used to feed horses suggests that carefully selecting flora when sowing grassland could also help overcome this problem.

Les prairies constituent un des agro-écosystèmes majeurs pour la nutrition des animaux d'élevage soit par le pâturage direct, soit par la production de fourrages. Bien que de nombreuses études concernant l'amélioration de la qualité nutritive des fourrages pour le bétail aient été menées, **très peu d'attention a été portée sur l'amélioration de la qualité sanitaire des fourrages destinés à l'alimentation des chevaux alors que cette dernière est primordiale pour leur santé respiratoire.**

Les maladies pulmonaires équine sont une des principales causes de perte de performances des chevaux dans l'hémisphère nord, où ils passent la plupart de leur temps

dans des box. L'effectif équin mondial étant d'environ 58,8 millions d'individus dont environ 3,7 millions localisés en Europe et environ un million en France (Haras Nationaux, 2008), **ces maladies pulmonaires constituent, par conséquent, un enjeu économique important.**

Parmi ces pathologies, la **Maladie Obstructive Récurrente des Voies Respiratoires (MORVR)** est devenue l'une des préoccupations majeures des éleveurs de chevaux car sa prévalence peut atteindre, dans certaines régions, jusqu'à 50 % de la population équine. La MORVR, également connue sous les noms de "bronchite chronique", "emphysème" ou encore "heaves" pour les anglo-saxons (CLARKE, 1992), présente des similitudes avec l'asthme ou

AUTEURS

1 : GRECAN EA1772 - IFR 146 ICORE, Université de Caen Basse-Normandie et Centre François Baclesse, Avenue du Général Harris, BP 5026, F-14076 Caen cedex 05 ; seguin.vir@gmail.com

2 : UMR INRA/UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N.C.S., Université de Caen, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen cedex ; servane.lavenant@unicaen.fr

3 : Unité expérimentale INRA du Pin, Domaine du Pin-au-Haras, F-61310 Exmes

MOTS CLÉS : *Aspergillus*, conservation de la récolte, enrubannage, équin, espèce fourragère, foin, fourrage, *Fusarium*, houlque laineuse, mycotoxine, pathologie animale, prairie, séchage, séchage en grange.

KEY-WORDS : Animal disease, *Aspergillus*, barn drying, crop conservation, drying, forage, forage species, *Fusarium*, grassland, hay, horses, mycotoxin, wrapping, Yorkshire fog.

RÉFÉRENCE DE L'ARTICLE : Séguin V., Garon D., Lemauviel-Lavenant S., Gallard Y., Ourry A. (2011) : "Comment améliorer la qualité sanitaire des fourrages pour réduire les pathologies respiratoires équine ?", *Fourrages*, 207, 181-188.

les maladies occupationnelles chez l'homme. Cette pathologie est caractérisée par des signes cliniques variables allant d'une accumulation de mucus dans les voies aériennes à la présence d'une toux chronique ou à de l'intolérance à l'exercice. Elle peut même, dans certains cas extrêmes, entraîner le décès de l'animal (MAIR et DERKSEN, 2000). L'étiologie de la MORVR est encore mal connue mais semble être multifactorielle et certainement d'origine environnementale. La MORVR semble, en effet, être induite ou exacerbée par l'inhalation chronique et répétée d'aérosols présents dans l'environnement proche des chevaux et plus particulièrement dans les fourrages (CLARKE, 1992 ; ROBINSON, 2001). **Plusieurs aérosols sont déjà incriminés dans l'étiologie de la MORVR** : les poussières respirables (VANDENPUT *et al.*, 1997), les moisissures telles qu'*Aspergillus fumigatus* (CLARKE et MADELIN, 1987 ; VANDENPUT *et al.*, 1997), les pollens (WARD et COUËTIL, 2005) et les endotoxines (PIRIE *et al.*, 2003). Les moisissures étant impliquées dans l'étiologie de la MORVR, il est possible que les mycotoxines aient également un impact. Leur rôle dans l'étiologie de la MORVR n'ayant pour l'instant pas été étudié, il est à envisager en tant qu'hypothèse.

Le contrôle de l'environnement proche de l'animal, qui inclut la diminution de la concentration en aérosols, paraît essentiel pour réduire la prévalence de la MORVR (CLÉMENT et PIRIE, 2007). Pour réduire la MORVR, les éleveurs ont d'ores et déjà recours à des pratiques telles que la mise au pâturage (VANDENPUT *et al.*, 1998), l'utilisation de fourrages et de litières pauvres en poussières (enrubannage ou granulés ; VANDENPUT *et al.*, 1997), l'amélioration de la ventilation au sein de l'écurie (SAINSBURY, 1981) ou encore le trempage du foin (MOORE-COLYER, 1996). Les fourrages, et plus particulièrement le foin, étant les principaux aliments apportés aux chevaux, l'amélioration de leur qualité sanitaire semble alors être un principe de précaution essentiel susceptible de réduire la prévalence de la MORVR. Dans cette optique, la caractérisation de la qualité sanitaire puis l'identification des facteurs qui la régissent, sont nécessaires.

Cet article présente les principaux résultats des travaux (SÉGUIN, 2009 ; SÉGUIN *et al.* 2010a, 2010b) réalisés dans le cadre du programme "Qualifoin" dont l'objectif a été d'évaluer la qualité sanitaire des fourrages *via* la quantification et la caractérisation biologique des poussières respirables (diamètre inférieur à 5 µm) présentes dans les fourrages et d'identifier les facteurs influençant cette qualité. Trois types de facteurs ont été étudiés dans ce projet de recherche : les pratiques culturales, la composition floristique et les conditions météorologiques.

1. Analyse de fourrages produits en Normandie et de fourrages commerciaux

Dans cette étude, trois séries d'analyses ont été effectuées :

- des analyses de foins monospécifiques produits expérimentalement en 2008 (SÉGUIN *et al.*, 2010b) destinés

à évaluer plus particulièrement l'effet de la composition floristique sur la qualité sanitaire des fourrages ;

- des analyses de foins plurispécifiques produits expérimentalement, avec une diversité de pratiques, en 2007 (SÉGUIN *et al.*, 2010a) et 2008 (SÉGUIN, 2009) afin d'évaluer l'effet de ces pratiques culturales sur la qualité sanitaire des fourrages ;

- des analyses de foins commerciaux pour les comparer aux fourrages expérimentaux produits en Normandie.

Les caractéristiques de ces différents fourrages sont décrites ci-après.

■ Fourrages expérimentaux

Les deux types de fourrages, foins monospécifiques et plurispécifiques (foins ou enrubannés), ont été récoltés au sein du Domaine Expérimental INRA du Pin-au-Haras (Orne) situé en Basse-Normandie, à partir de la même prairie permanente, les foins monospécifiques ayant été réalisés par récolte manuelle spécifique.

• Présentation de la prairie et des pratiques de récolte du foin

Cette prairie de 5 ha est dominée par *Poa trivialis*, *Alopecurus geniculatus*, *Holcus lanatus*, *Ranunculus repens*, *Trifolium repens* et *Lolium perenne*. Elle présente donc une flore typique des prairies bas-normandes (DIQUÉLOU *et al.*, 2003).

Cette parcelle est habituellement soumise à un chaulage de 1,6 t/ha tous les 4 ans, en alternance avec une fertilisation organique apportée tous les 2 ans, sous forme de compost (15 à 20 t/ha) avec quelquefois un apport de lisier (30 m³/ha), avec une fertilisation azotée annuelle de 150-180 kg N/ha dont 60-80 kg N apportés au printemps et le reste en 2 apports fractionnés après chaque coupe. Un désherbage chimique annuel des adventices et une destruction des taupes à l'aide de pièges sont également réalisés.

La production de foin est réalisée en 2 coupes à l'aide d'une faucheuse - conditionneuse : une coupe à 5 cm, en début d'épiaison, c'est-à-dire début juillet en général (en fonction des conditions météorologiques), puis la coupe des regains, à 45 jours. Après la coupe, la prairie est fanée une première fois, puis une à deux fois par jour, selon les conditions météorologiques, et ceci jusqu'à l'obtention d'un pourcentage de matière sèche de 85 % (*i.e.* 4 à 5 jours après la coupe). Le foin est ensuite pressé en bottes carrées de faible densité (116 kg/m³). Avant la mise en botte, le taux de matière sèche est évalué au champ, à l'aide d'une sonde permettant de déterminer le taux d'humidité dans l'andain¹.

• Foins monospécifiques

Cinq espèces caractéristiques des prairies bas-normandes ont été choisies pour la production des foins monospécifiques : quatre graminées (*Lolium perenne*,

1 : humidimètre pour fourrage Wile 5 et sonde destinée au foin, Gaston Richard, Sainte Julie (Canada)

Traitements ¹	Année de production	Période de récolte ²	Taux de MS théorique (g/kg MF)
Témoin	2007-2008	P et T	850
Absence de fertilisation	2007	P	850
Enrubanné	2007-2008	P et T	650
Séchage en grange	2007-2008	P	650
Fanage supplémentaire (2 par jour <i>versus</i> 1 par jour)	2008	P	850
Pluie avant coupe (10 mm de pluie avant coupe)	2008	P et T	850
Pluie après coupe (2 x 10 mm de pluie 24 et 48 h après coupe)	2007-2008	P et T	850
Récolte à 85% MS + bactérie lactique	2008	P	850
Récolte à 85% MS + acide propionique	2008	P	850
Récolte à 75% MS	2007-2008	P et T	750
Récolte à 75% MS + bactérie lactique	2008	P	750
Récolte à 75% MS + acide propionique	2008	P	750
Fanage tardif (1 ^{er} fanage 48h après la coupe)	2007-2008	T	850
Présence de taupinières (1 pour 10 m ²)	2007-2008	T	850
Présence de crottins (1 pour 10 m ²)	2007-2008	T	850
Coupe à 7 cm	2007	T	850
Coupe à 3 cm	2008	T	850
Densité de pressage supérieure (136 kg/m ³ au lieu de 116 kg/m ³)	2007	T	850
Regain (seconde coupe)	2007-2008	T	850

1 : Sauf mention particulière, la hauteur de coupe est de 5 cm, le séchage réalisé au champ, et le pressage en petite botte carrée est effectué à une densité de 116 kg/m³
 2 : P, Précoce ; T, Tardive

TABLEAU 1 : Description des foins produits expérimentalement en 2007 et/ou 2008.

TABLE 1 : Description of experimentally-produced hay in 2007 and/or 2008.

Alopecurus geniculatus, *Poa trivialis* et *Holcus lanatus*) et une légumineuse (*Trifolium repens*).

Chacune de ces espèces a été **récoltée individuellement à la main** à 5 cm du sol, puis fanée une fois par jour jusqu'à l'obtention d'un taux de matière sèche de 85 %. Ces fourrages ont ensuite été stockés en vrac dans des sacs perforés dans une étable à température ambiante jusqu'à analyse.

• Foins plurispécifiques

Les pratiques culturales testées lors de ces expérimentations ont été choisies après avoir effectué une analyse bibliographique approfondie. Afin d'éviter les effets de bordures, une surface homogène en termes de composition floristique au centre de la prairie a été utilisée pour produire les fourrages plurispécifiques. Cette surface a ensuite été scindée en **13 blocs** de 660 m² en 2007 et **18 blocs** de 600 m² en 2008. Ces blocs étaient séparés les uns des autres par des couloirs de 2 m pour éviter toute contamination entre les différents traitements. Des fourrages "témoin" ont été récoltés, pour chaque période de coupe (précoce ou tardive), en 2007 et 2008. Les conditions de récolte de ces fourrages "témoins" ont été présentées précédemment.

Sur chaque bloc, différents traitements ont été appliqués comme par exemple :

- l'apport ou non de fertilisation azotée (150-180 kg N/ha/an apportés en 3 fois) ;
- la simulation d'une pluie avant coupe (apportée à l'aide d'une rampe d'arrosage le matin de la fauche) et après coupe ;
 - des hauteurs de coupe variables (3, 5 et 7 cm) ;
 - des périodes de coupe précoce (début épiaison) ou tardive (fin épiaison) ;
 - des modes de séchage contrastés (séchage au champ jusqu'à 85 % de MS en grange *versus* séchage en

grange). Le foin séché en grange était récolté à 65 % MS à l'aide d'une auto-chargeuse, puis séché en grange jusqu'à 85 % MS et enfin pressé en botte carrée de faible densité ;

- des perturbations susceptibles d'amplifier le niveau de contamination fongique telles que la mise en place de taupinières ou de crottins. Les taupinières ont été prélevées sur le domaine du Pin puis déposées sur la parcelle et les crottins ont été fournis par la jumenterie du Haras-du-Pin. Il n'y avait à l'origine aucune taupinière au sein de la prairie et cette dernière n'a jamais été pâturée par des chevaux ;

- un fanage tardif correspondant à un premier fanage réalisé 48 h après coupe ; cette pratique est couramment employée dans les haras qui font appel à un entrepreneur agricole pour leur production de foin ;

- l'utilisation d'additifs de conservation sur fourrage sec récolté à 75 % ou 85 % MS. Deux types d'additifs ont été testés : un additif à base d'acide propionique et les bactéries lactiques. Ce premier additif² est une combinaison d'acides tamponnés, non corrosifs, constituée d'acide propionique et de benzoate de sodium. Il a été appliqué selon les recommandations du fabricant (5 l par tonne de fourrage sec juste avant le pressage à l'aide d'un pulvérisateur à main). Les bactéries lactiques ont été appliquées à hauteur de 20 g par tonne de fourrage sec comme suggéré par le fabricant ;

- le mode de conditionnement (foin sec *versus* enrubbanné) ; etc.

L'ensemble des traitements testés lors de cette expérimentation est résumé dans le tableau 1.

La deuxième année de production visait à confirmer l'effet des traitements ayant eu un effet significatif sur la qualité sanitaire des fourrages en 2007 mais également à tester de nouveaux traitements comme l'utilisation d'additifs de conservation.

2 : CleanGrain liquid, Biomin, Parc Technologique du Zoopôle, rue Irène Joliot-Curie, F-22440 Ploufragan

■ Fourrages commerciaux

Quatre fourrages commerciaux utilisés dans l'alimentation équine ont été choisis : 2 enrubannés et 2 foins. Les enrubannés étaient : l'**Enrubanné Gr** ('Chevalhage' ; La Garenne, Langonnet, F-56630 Bretagne ; <http://www.haylage.biz>) récolté en mai à partir d'une prairie semée de 4 graminées (*Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Festuca rubra* et *Poa pratensis*), et l'**Enrubanné Lm** (ECOLIT ; Haras de la Chapelle, F-14370 Croissanville ; <http://www.ecolit.com>) récolté également en mai 2008 et constitué uniquement de *Lolium multiflorum*. Les 2 foins étaient : le **Foin de Crau** récolté en 2008 (*Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Festuca pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Lotus corniculatus*, *Medicago spp.*, *Vicia cracca*) et le **Foin de type Suisse** produit en 2008 à partir d'une prairie localisée au Domaine Expérimental INRA du Pin-au-Haras semée d'*Alopecurus pratensis*, *Festuca pratensis*, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Poa trivialis*, *Rumex obtusifolius*, *Taraxacum officinale* et *Ranunculus repens*.

■ Analyse de la qualité sanitaire des fourrages

Les fourrages ont été stockés en étable en attendant les analyses. Trois échantillons pour les foins monospécifiques et 4 bottes pour les foins plurispécifiques et commerciaux, sont récoltés au hasard puis soumis aux différentes analyses (quantification des poussières, moisissures, mycotoxines, pollens, endotoxines). Pour les quantifications de poussières, étant donné l'hétérogénéité au sein même d'une botte, 10 quantifications sont réalisées pour chaque botte, soit 40 quantifications effectuées pour un traitement.

L'analyse de la qualité sanitaire a reposé essentiellement sur la quantification et la caractérisation des poussières respirables (SÉGUIN, 2009). La méthode employée est adaptée de la méthode standardisée et mise au point par VANDENPUT *et al.* (1997).

Pour collecter et quantifier les poussières, une enceinte hermétique à gants de 200 litres est connectée à un compresseur permettant l'arrivée d'un flux d'air constant de 200 l/minute. Cette enceinte est ensuite connectée à une deuxième enceinte hermétique (80 l) dans laquelle est disposé le compteur de particules aériennes. Ce système permet à la fois de quantifier les particules par classes de taille (de 0,3 à 20 µm) et de collecter les particules aspirées sur un filtre qui se trouve à l'arrière de l'appareil. Ce filtre sert par la suite aux analyses microbiologiques (comptage et identification des moisissures, quantification des mycotoxines). Lors d'une analyse, l'échantillon de 100 g est scellé dans un sac hermétique puis placé dans l'enceinte hermétique à gants. Un flux d'air constant est engagé afin d'évacuer toutes les poussières présentes initialement. L'échantillon de foin est ensuite brassé manuellement durant 30 secondes. La mesure dure jusqu'à ce que l'appareil revienne à son état initial. Après la mesure, le filtre est conservé soit à 4°C

pour les comptages et identifications des souches fongiques, soit à -20°C pour les analyses de mycotoxines.

La **mise en culture des poussières en vue de la quantification et l'identification des moisissures** est réalisée au GRECAN. Après avoir réalisé les dilutions nécessaires, les poussières en suspension sont mises en culture sur un milieu malt (1,5 %) / agar (1,5 %) (MEA) contenant du chloramphénicol (0,05 %, w/v) puis incubées à 25 et 30°C durant 7 jours. Un comptage est ensuite réalisé une fois par jour pendant 7 jours. À l'issue de ces comptages, la concentration en organismes fongiques, exprimée en Unité Formant Colonie (UFC) est déterminée. Après purification sur MEA, les colonies sont identifiées sur différents milieux spécifiques. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont cultivés et identifiés sur CYA (Czapek Yeast autolysate Agar) et sur G25N (25 % glycerol nitrate agar), les *Fusaria* sur PDA (Potato Dextrose Agar medium) (BOOTH, 1966 ; PITT, 1979). L'identification des souches fongiques est réalisée après observations macro- et microscopiques (PITT, 1979 ; KLICH, 2002 ; SAMSON *et al.*, 2002).

Les analyses multi-mycotoxines réalisées à partir des poussières ou à partir de la matrice végétale selon le protocole décrit par GARON *et al.* (2006) ainsi que les dosages des endotoxines ont été réalisés au Laboratoire Départemental Frank Duncombe. Enfin, les quantifications des pollens ont été réalisées au sein de l'UMR INRA/UCBN 950 par microscopie optique après extraction liquide des poussières présentes dans les fourrages.

Les données ont été soumises à des **analyses statistiques**. Après s'être assuré de leur normalité et de l'homogénéité des variances, une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée. Lorsque l'ANOVA révélait un effet significatif du traitement sur les paramètres de qualité sanitaire, les moyennes ont été confrontées par un test de Tukey. Cependant, dans la majorité des cas, les conditions exigées pour l'utilisation des tests n'étant pas remplies, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé. Des tests de la Médiane de Mood ont été réalisés lorsque le test de Kruskal-Wallis montrait qu'il existait un effet significatif des traitements ou du type de fourrage sur les paramètres de qualité sanitaire (SOKAL et ROHLF, 2003).

Pour la suite de l'article, étant donné le grand nombre de résultats obtenus lors de la production expérimentale de fourrages, **seuls les résultats les plus significatifs** de certains traitements appliqués soit en 2007, soit en 2008 **seront présentés**.

2. Principaux résultats

■ Effets des pratiques culturales et des conditions climatiques

Le tableau 2 synthétise les effets des facteurs testés sur la qualité sanitaire des fourrages produits expérimentalement en 2007 et 2008 et permet également de définir les pratiques à favoriser.

Traitement	UFC	<i>A. fumigatus</i>	Mycotoxines	Poussières respirables	Diversité fongique	Pollens	Contamination par le sol	Endotoxines
Enrubannage	--	0	+/-	---	=	++	++	+++
Séchage en grange	--	+	0	++	++	=	=	+++
Seconde coupe	--	0	+	+/-	++	---	=	nd
Récolte à 75% MS + acide propionique	=	0	0	---	=	=	=	--
Récolte à 85% MS + bactéries lactiques	=	+	0	---	=	=	=	++
Nombre supérieur de fanages	=	0	0	=	=	=	=	nd
Récolte à 85% MS + acide propionique	=	0	0	=	=	=	=	=
Taupinières	=	+	+	=	=	=	++	nd
Pluie avant la coupe	=	0	0	++	=	=	=	0
Coupe à 7 cm	=	0	0	+++	=	=	=	nd
Crottins de cheval	=	+	0	+++	=	=	=	nd
Coupe à 3 cm	=	+	0	+++	+++	=	=	nd
Densité de pressage supérieure	+++	+	0	=	=	---	+++	=
Fanage tardif	++	+	+	=	=	=	=	nd
Récolte à 75% MS + bactéries lactiques	+++	0	+	+++	=	=	=	=
Récolte à 75% MS	+++	+	+	+++	++	=	+/-	+++
Pluie après la coupe	++	+/-	+/-	++	=	--	++	++

= : pas d'effet + : présent -- et ++ : peu ou pas d'effet nd : non déterminé
 0 : non détecté +/- : effet variable --- et +++ : effet très significatif

TABLEAU 2 : Tableau récapitulatif des effets des pratiques culturales et des conditions météorologiques sur les critères d'évaluation de la qualité sanitaire des foins (expérimentations réalisées au champ en 2007 et 2008).

TABLE 2 : Table recapitulating the effect of cultivation practices and weather conditions on criteria used to evaluate hay safety (field experiments in 2007 and 2008).

Certaines pratiques (coupe trop basse, fanage tardif, séchage insuffisant avant pressage) ou conditions climatiques (pluie durant la récolte) conduisent à une dégradation de la qualité sanitaire des fourrages secs (SÉGUIN, 2009 ; SÉGUIN *et al.*, 2010a). Cette dégradation peut se traduire par une augmentation des poussières respirables.

En effet, l'application d'une coupe basse (3 cm) entraîne une contamination du foin par le sol lors du pressage et donc une densité de poussières élevée ($5,2 \cdot 10^7$ particules/g de foin, figure 1). Une augmentation de la contamination fongique ainsi que la production d'une mycotoxine, la zéaralénone, sont également observées dans le cas de certains traitements comme le fanage tardif qui présentait $1,5 \cdot 10^6$ UFC/m³ (figure 2) et 2,38 mg de zéaralénone/kg de foin. Lors du traitement "fanage tardif", le foin fraîchement coupé à 5 cm est laissé au sol sans être fané et avec un taux d'humidité élevé durant les premières 48 h, ce qui correspond ainsi aux conditions optimales pour la prolifération fongique et la production de la zéaralénone (COULOMBE, 1993). Cette mycotoxine, dont les principaux effets sont œstrogéniques (HAGLER *et al.*, 2001), est produite par certaines espèces du genre *Fusarium*. Chez le cheval, une étude a mis en évidence le développement de mycotoxicose après ingestion de maïs contaminés à hauteur de 2,6 ppm de zéaralénone (GIMENO et QUINTANILLA, 1983). Parmi les espèces fongiques identifiées dans les différents fourrages produits expérimentalement, les genres *Penicillium* et *Aspergillus* (plus particulièrement ceux du groupe *glaucus*), sont les plus représentés.

D'autres résultats nous paraissent également intéressants. En effet, la présence de taupinières au sein d'une prairie entraîne une plus forte contamination du foin par le sol, laquelle explique la présence de zéaralé-

none (<25 µg de zéaralénone/kg de foin) qui est produite par des espèces telluriques comme les *Fusaria*. De même, il s'est avéré que la présence de crottins de cheval augmentait la contamination par les poussières et des organismes potentiellement toxigènes et incriminés dans la MORVR comme *Aspergillus fumigatus*.

Les foins ayant subi une pluie après coupe et ceux pressés à 75 % MS présentent la plus mauvaise qualité sanitaire, à savoir, une augmentation conjointe des poussières respirables (respectivement $1,4 \cdot 10^8$ et $8,1 \cdot 10^7$ particules/g de foin ; figure 1), de la production de spores

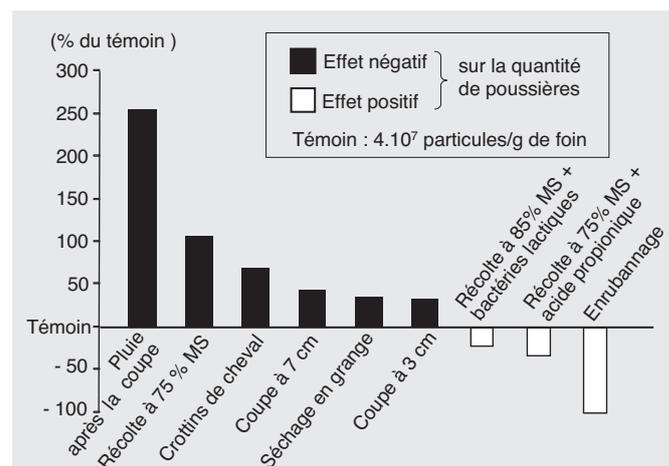


FIGURE 1 : Quantité de poussières respirables contenues dans les foins produits expérimentalement pour quelques uns des traitements ayant un effet significatif (en % du foin témoin de l'année correspondante).

FIGURE 1 : Quantity of dust breathed in by horses in experimentally-produced hay using different practices with a proven impact (% compared to control hay for the corresponding year).

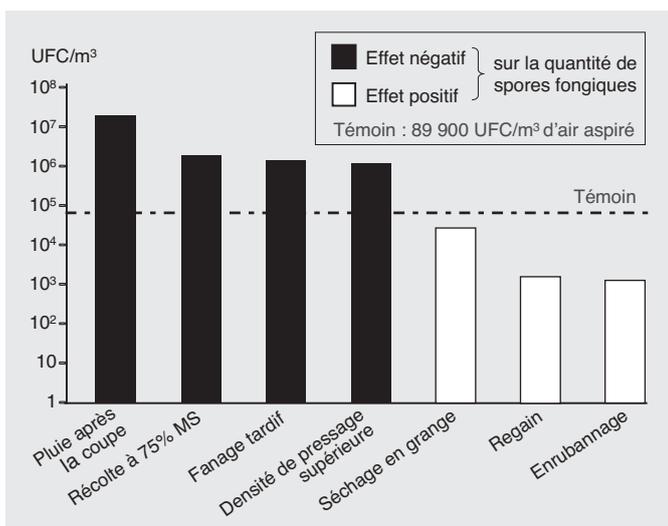


FIGURE 2 : Concentrations moyennes en spores fongiques viables (en Unité Formant Colonie par m³ d'air aspiré, UFC/m³) après culture à 25°C des poussières respirables contenues dans les foins produits expérimentalement pour quelques uns des traitements ayant un effet significatif (résultats présentés en échelle logarithmique).

FIGURE 2 : Average concentration of viable fungal spores (in Colony forming units per m³ of air breathed in by horses, UFC/m³), after culture at 25°C in dust breathed in by horses from experimentally-produced hay using different practices with a proven impact (logarithmic scale).

fongiques (respectivement 1,8. 10⁶ et 2. 10⁷ UFC/m³ ; figure 2) et une accumulation d'endotoxines et d'une mycotoxine, la zéaralénone (respectivement 89 et 152 mg/kg de foin). Dans ces fourrages, on observe également la présence d'espèces fongiques potentiellement toxigènes comme *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* ou encore *Aspergillus terreus*. *Aspergillus fumigatus* peut produire plusieurs mycotoxines comme la gliotoxine aux propriétés immunosuppressives (UPPERMAN et al., 2003). De plus, *Aspergillus fumigatus* ainsi qu'*Aspergillus niger* et *Emericella nidulans* sont les principaux agents causaux des aspergilloses dans les poches gutturales chez le cheval dont les signes cliniques peuvent être des saignements de nez ou encore des difficultés à déglutir (GUILLOT et al., 1996).

À l'inverse, certaines pratiques tendent à améliorer la qualité sanitaire des fourrages. Le séchage en grange a permis de réduire la contamination fongique de 72 % en 2007 et de 98 % en 2008 par rapport à un foin témoin séché au champ (figure 2). Cependant, ce type de séchage peut entraîner des cassures de la matrice végétale susceptibles de générer une faible augmentation des poussières (figure 1). Dans ces conditions expérimentales, l'utilisation d'enrubannage permet, quant à elle, une réduction significative des poussières ainsi que de la contamination fongique. Toutefois, une augmentation de la quantité de pollens est observée dans ces fourrages. Ceci peut s'expliquer par le fort taux d'humidité de la matrice végétale qui piège les pollens. Lorsque les conditions climatiques ne permettent pas de récolter le foin à 85 % MS, l'utilisation d'acide propionique sur un foin

humide s'est révélée très intéressante car elle a permis de réduire la quantité de poussières et la contamination fongique d'environ 77 % (et notamment celle des espèces potentiellement toxigènes) par rapport au foin témoin récolté à 75 % MS sans additif.

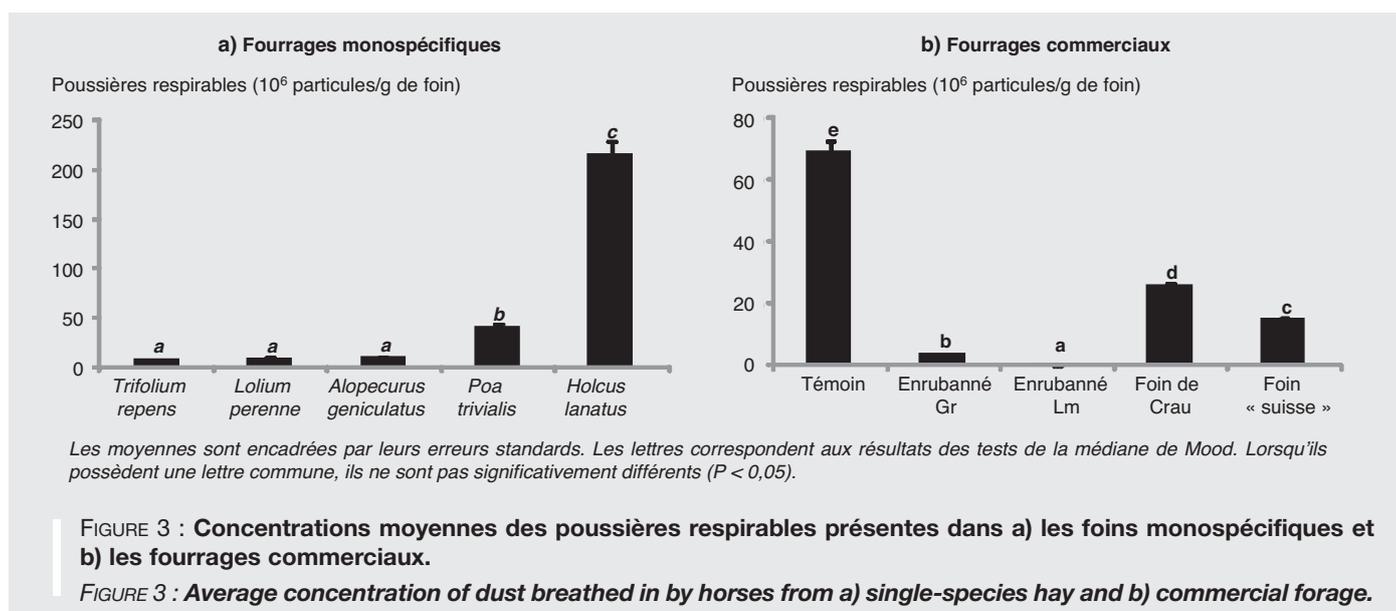
■ Effets de la composition floristique

La composition floristique d'une prairie influence la qualité nutritive du foin (MOREL et al., 2006). Au travers de l'analyse des foins de diverses origines floristiques (foins plurispécifiques, foin commerciaux, foin monospécifiques), nous avons voulu savoir si la composition floristique conditionnait également la qualité sanitaire (SÉGUIN et al., 2010b).

Les agriculteurs savent que le foin constitué de houlque laineuse (*Holcus lanatus*) produit beaucoup de poussières et ils cherchent à éviter cette espèce dans les prairies de fauche. Notre étude a confirmé cette connaissance empirique : la houlque occasionne en effet la plus forte production de poussières avec 2,2. 10⁸ particules/g de foin (figure 3a). C'est toutefois l'espèce qui est caractérisée par la plus faible contamination fongique avec 3,3. 10⁴ UFC/m³ (tableau 3). L'observation à la loupe binoculaire des poussières des foins monospécifiques nous a permis de constater que leurs compositions étaient différentes. La poussière issue du foin de houlque, espèce caractérisée par une forte pilosité, est dominée par des poils très fins alors que la poussière issue des foins des autres espèces correspond plus à des fragments de tissus de l'appareil végétatif en général.

Les espèces végétales présentent des aptitudes différentes à la dessiccation (JONES et PRICKETT, 1981). Les légumineuses ont une meilleure capacité de séchage ; elles devraient donc être moins contaminées par les organismes fongiques. Cependant, dans notre étude, il s'est avéré que le trèfle blanc ne se différencie pas de la plupart des graminées par une plus faible contamination fongique (tableau 3). En effet, seul le foin monospécifique de houlque laineuse se différencie des autres, par un plus faible contenu en moisissures. Chacune des espèces végétales est caractérisée par son propre profil de contamination fongique. Par exemple *Penicillium variable* a été identifié uniquement dans le foin de houlque laineuse et *Aspergillus terreus*, uniquement dans le foin de vulpin. Des études ont montré l'existence de relations étroites entre espèces végétales et espèces fongiques comme, par exemple, les champignons symbiotiques (ELLIS et ELLIS, 1985). Les mécanismes permettant d'expliquer ces interactions sont encore mal connus et pourraient être liés à la composition de la paroi des végétaux et à la capacité des espèces fongiques à hydrolyser préférentiellement, en synergie ou non, tel ou tel polymère pariétal.

Des fourrages commercialisés spécifiquement pour l'alimentation équine ont également été analysés et comparés entre eux ainsi qu'avec le foin témoin récolté en 2008. Les deux enrubannés Gr et Lm se sont révélés de qualités contrastées. L'enrubanné Lm présente une plus grande contamination fongique, principalement du fait de



son plus fort taux d'humidité (52 % MS contre 78 % pour l'enrubanné Gr). Mais cette différence peut aussi provenir de leurs conditions de stockage ainsi que de leur composition floristique. **Les foins commerciaux présentent tous une meilleure qualité sanitaire que le foin témoin** produit expérimentalement en 2008 (figure 3, tableau 3). Ils contiennent peu de poussières, d'organismes fongiques, d'endotoxines et de pollens et aucune mycotoxine parmi celles qui ont été recherchées. Cependant, l'enrubanné Lm contenait une espèce fongique, *Penicillium roqueforti*, qui est caractéristique des enrubannés et ensilages dont les conditions anaérobies ont été rompues.

Des relations entre les foins plurispécifiques, monospécifiques et les foins commerciaux ont été mises en évidence en raison de leurs compositions floristiques. Par exemple, le foin témoin et le foin de Crau contenaient de la houlque et étaient plus poussiéreux que le foin de type Suisse qui n'en contenait pas. Des espèces fongiques identifiées spécifiquement dans un foin monospécifique étaient également identifiées dans un foin commercial contenant cette espèce végétale. C'est le cas du genre *Rhizomucor* identifié dans les foins de vulpin et de trèfle blanc mais aussi dans le foin de mélange de semences typiques de Suisse, qui contenait ces deux espèces végétales.

3. Préconisations et perspectives de recherche

A l'issue de ce travail, des propositions d'amélioration de la qualité sanitaire du fourrage pour les équins se dessinent. L'étude des foins monospécifiques et commerciaux a, quant à elle, permis de définir les espèces qui sont à favoriser dans les prairies.

Ainsi, **en Normandie, il peut être préconisé de produire du foin à partir d'une prairie permanente dominée par *Trifolium repens*, *Lolium perenne* et *Poa trivialis*, et fauchée précocement**, c'est-à-dire au début de l'épiaison, fin mai - début juin. Il serait préférable

d'araser les taupinières et d'éviter un pâturage préalable de cette parcelle par des chevaux. De plus, des **conditions météorologiques sèches et venteuses** au moment de la réalisation du foin favorisent une meilleure qualité sanitaire. La **hauteur de coupe doit être de 5 cm environ et le foin doit être fané peu après la coupe**, puis une à deux fois par jour pendant 4 à 5 jours, selon la météorologie, pour atteindre un taux de 85 % MS.

Les conditions ne permettant pas toujours de récolter un foin à 85 % MS, il est conseillé dans ce cas de sécher le fourrage en grange ou de l'enrubanner ou encore d'utiliser des additifs de conservation comme

	Concentration de spores fongiques (10 ³ UFC/m ³ d'air aspiré)	
	Moyenne	Ecart type
Fourrages monospécifiques		
- <i>Trifolium repens</i>	165 ^b	27
- <i>Lolium perenne</i>	361 ^b	180
- <i>Alopecurus geniculatus</i>	390 ^b	169
- <i>Poa trivialis</i>	228 ^b	105
- <i>Holcus lanatus</i>	33 ^a	7
Fourrages commerciaux		
- Témoin	1 303 ^b	356
- Enrubanné Gr	5 ^a	1
- Enrubanné Lm	75 ^b	27
- Foin de Crau	1 ^a	0,3
- Foin suisse	1 ^a	0,3

Deux moyennes qui possèdent une lettre commune, ne sont pas significativement différentes ($P < 0,05$)

TABEAU 3 : Concentrations moyennes des spores fongiques viables (en 10³ Unité Formant Colonie par mètre cube d'air aspirée, UFC/m³) après culture à 25°C des poussières respirables contenues dans les foins monospécifiques et les fourrages commerciaux.

TABEAU 3 : Average concentration of viable fungal spores (in 10³ Colony forming units per m³ of air breathed in by horses, UFC/m³) after culture at 25°C in dust breathed in by horses from single-species hay and commercial forage.

l'acide propionique. L'enrubannage devra être réalisé avec beaucoup de soin afin d'éviter la prolifération d'organismes fongiques potentiellement toxiques dont le développement peut être favorisé par une augmentation de la pression partielle en oxygène. Une coupe des regains est aussi intéressante, notamment pour le faible contenu en pollens et en organismes fongiques, mais elle peut contenir des toxines comme la zéaralénone.

La production d'un foin sur une prairie semée est également intéressante pour obtenir une bonne qualité sanitaire comme cela a été démontré par le foin obtenu à partir d'un mélange de semences prairiales suisses (*Festuca pratensis*, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens* et *Alopecurus pratensis*).

Au vu de ces résultats, des perspectives de recherche se dessinent. Il serait en effet intéressant, à moyen terme, de réaliser une autre série d'expérimentations au champ au cours de laquelle les pratiques ayant permis d'améliorer la qualité sanitaire seraient appliquées individuellement ou en interaction et ceci à la fois sur une prairie naturelle et sur des prairies temporaires de compositions floristiques variables, voire même dans des régions différentes.

D'autres aspects pourraient également être étudiés comme les processus liés au stockage. En effet, certains facteurs abiotiques comme le pH et la température interne des bottes durant le stockage peuvent expliquer la composition myco-floristique et la diversité fongique. De plus, la présence de *Penicillium roqueforti* dans les enrubannages, mais aussi de *Stachybotrys* dans certains fourrages, invite à intégrer leurs mycotoxines dans la méthode d'analyse multi-mycotoxines.

Accepté pour publication,
le 15 juillet 2011.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOOTH C (1966) : *The Genus Fusarium*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K., 237 p.
- CLARKE A.F. (1992) : "Chronic Obstructive Pulmonary Disease", *Current therapy in equine medicine*, n°3, Robinson N.E., Saunders ed., Philadelphia, 329-332.
- CLARKE A.F., MADELIN T. (1987) : "Technique for assessing respiratory health hazards from hay and other source materials", *Equine Vet. J.*, 19 (5), 442-447.
- CLEMENTS J., PIRIE R. (2007) : "Respirable dust concentrations in equine stables. Part 2: The benefits of soaking hay and optimising the environment in a neighbouring stable", *Res. Vet. Sci.*, 83 (2), 263-268.
- COULOMBE R.A. (1993) : "Symposium: Biological action of mycotoxins", *J. Dairy Sci.*, 76, 880-891.
- DIQUELOU S., LECONTE D., SIMON J.C. (2003) : "Diversité floristique des prairies permanentes de Basse-Normandie (synthèse des travaux antérieurs)", *Fourrages*, 173, 3-22.
- ELLIS M.B., ELLIS J.P. (1985) : *Microfungi on land plants: an identification handbook*, London, Sydney, Croom Helm, 868 p.
- GARON D., RICHARD E., SAGE L., BOUCHART V., POTTIER D., LEBAILLY P. (2006) : "Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study", *J. Agr. Food Chem.*, 54 (9), 3479-3484.
- GIMENO A., QUINTANILLA J.A. (1983) : "Analytical and mycological study of a natural outbreak of zearalenone mycotoxicosis in horses", *Proc. Int. Symp. Mycotoxins*, National Research Centre, Caire, Egypt, 387-392.
- GUILLOT J., RIBOT X., CADORÉ J.L., BORNERT G. (1996) : "L'aspergillose des poches gutturales des équidés", *Bulletins de la Soc. Vét. Prat. de France*, 80, 141-162.
- HAGLER W.M.JR., TOWERS N.R., MIROCHA C.J., EPPLEY R.M., BRYDEN W.L. (2001) : "Zearalenone: Mycotoxins or mycoestrogen?", *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*, B.A. Summerell, J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden & Burgess (eds), APS Press, St Paul, Minnesota, 321-331.
- Haras Nationaux (2008) : www.haras-nationaux.fr
- JONES L., PRICKETT J. (1981) : "The rate of water loss from cut grass of different species dried at 20°C", *Grass Forage Sci.*, 36, 23-28.
- KLICH M.A. (2002) : *Identification of Common Aspergillus Species*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 116 p.
- MAIR T.S., DERKSEN F.J. (2000) : "Chronic Obstructive Pulmonary Disease: a review", *Equine Vet. Educ.*, 12(1), 35-44.
- MOORE-COLYER M.J.S. (1996) : "Effects of soaking hay fodder for horses on dust and mineral content", *Anim. Sci.*, 63, 337-342.
- MOREL I., WYSS U., COLLOMB M., BÜTIKOFER U. (2006) : "Influence de la composition botanique de l'herbe ou du foin sur la composition du lait", *Rev. Suisse Agric.*, 38(1), 9-15.
- PIRIE R.S., COLLIE D.D.S., DIXON P.M., MCGORUM B.C. (2003) : "Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma)", *Clin. Exp. Allergy*, 33, 676-683.
- PITT J.I. (1979) : *The Genus Penicillium and Its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*, Academic Press, London, U.K., 634.
- ROBINSON N.E. (2001) : "Chairperson's introduction: International Workshop on Equine Chronic Airway Disease", Michigan State University, 16-18 June 2000, *Equine Vet. J.*, 33, 5-19.
- SAINSBURY D.W.B. (1981) : "Ventilation and environment in relation to equine respiratory disease", *Equine Vet. J.*, 13, 167-170.
- SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C., FILTENBORG O. (2002) : *Introduction to Food and Airborne Fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht, The Netherlands, 389 p.
- SÉGUIN V. (2009) : *Contribution à l'étude de la qualité sanitaire du fourrage équin : effets des pratiques culturales et de la composition floristique*, thèse, Université de Caen/Basse Normandie, 212 p.
- SÉGUIN V., LEMAUVIEL-LAVENANT S., GARON D., BOUCHART V., GALLARD Y., BLANCHET B., DIQUELOU S., PERSONENI E., GAUDUCHON P., OURRY A. (2010A) : "Optimising agricultural practices to increase hay quality evaluated through dustiness and amounts of aeroallergens in order to prevent equine respiratory disease", *Agric. Ecosys. Environ.*, 135, 206-215.
- SÉGUIN V., LEMAUVIEL-LAVENANT S., GARON D., BOUCHART V., GALLARD Y., BLANCHET B., DIQUELOU S., PERSONENI E., GAUDUCHON P., OURRY A. (2010B) : "An evaluation of the hygienic quality in single-species hays and commercial forages used in equine nutrition", *Grass Forage Sci.*, 65, 304-317.
- SOKAL R.R., ROHLF F.J. (2003) : *Biometry*, 3rd edition, W.H. Freeman Compagny, New York, 887 p.
- UPPERMAN J.S., POTOKA D.A., ZHANG X.R., WONG K., ZAMORA R. FORD H.R. (2003) : "Mechanism of intestinal-derived fungal sepsis by gliotoxin, a fungal metabolite", *J. Pediatr. Surg.*, 38, 966-970.
- VANDENPUT S., ISTASSE L., NICKS B., LEKEUX P. (1997) : "Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses", *Vet. Quart.*, 19 (4), 154-158.
- VANDENPUT S., VOTION D., DUVIER D.H., VAN ERCK E., ANCIAUX N., ART T., LEKEUX P. (1998) : "Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses", *Vet. J.*, 155, 189-195.
- WARD M.P., COUËTIL L.L. (2005) : "Climatic and aeroallergen risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in horses", *Am. J. Vet. Res.*, 66 (5), 818-824.