



Université de Caen
Basse-Normandie

UNIVERSITE de CAEN/BASSE-NORMANDIE

U.F.R. : Institut de biologie fondamentale et appliquée

Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement



EdNBISE
Ecole doctorale Normande
Biologie Intégrative,
Santé, Environnement

THESE

Présentée par

Mlle Virginie SÉGUIN

et soutenue

le 2 Décembre 2009

en vue de l'obtention du

DOCTORAT de l'UNIVERSITE de CAEN

Spécialité : Biologie et environnement des populations

Arrêté du 07 août 2006

Titre : Contribution à l'étude de la qualité sanitaire du fourrage équin : effets des pratiques culturales et de la composition floristique



MEMBRES du JURY

Mr Christian Huyghe, Directeur de Recherche, INRA Lusignan

Rapporteur

Mr Jacques Guillot, Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Rapporteur

Mme Emmanuelle van Erck, Consultante en médecine sportive équine, Université de Liège

Mr David Garon, Maître de Conférences, Université de Caen

Mme Servane Lemauviel-Lavenant, Maître de Conférences, Université de Caen

Mr Alain Ourry, Professeur, Université de Caen

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué au sein de deux laboratoires : l'UMR INRA 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutrition N.C.S. et le Groupe Régional d'Etude sur le Cancer (GRECAN) de l'Université de Caen Basse Normandie et a bénéficié d'une allocation de recherche financée par la Région Basse-Normandie. Ce projet a également été labellisé par le Pôle de compétitivité de la Filière Equine.

Durant ces années passées au sein de ces laboratoires, je tiens aujourd'hui à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé au cours de ces travaux.

Je remercie tout d'abord, Alain Ourry et Frédéric Le Dily qui se sont succédés à la direction de l'UMR EVA et Pascal Gauduchon, directeur du GRECAN, pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs.

Puis je tiens à remercier les trois personnes qui m'ont dirigée au cours de ces trois années et pour avoir développé ce projet de thèse et décroché une allocation de recherche :

*Merci, **Alain** d'avoir été mon directeur de thèse durant ces trois années. Merci pour ta disponibilité, ton franc-parler, tes conseils, ton dynamisme et ton optimisme. Merci d'être venu m'aider sur le terrain lors de la mise en place des crottins gentiment cédés par la Jumenterie du Haras-du-Pin. MERCI*

*Merci, **Servane** d'avoir dit 'oui' ce jour de 2005, où je me suis présentée à ton bureau pour un stage en M1 et pour ta patience car cela fait maintenant 5 ans que tu me supporte en tant qu'encadrante !!!! Notre collaboration était plutôt pas mal, non ? Et t'inquiète pas, désormais tu ne me fait plus peur (ou pas !) !!! Je te remercie également pour ta grande gentillesse, ta disponibilité et pour m'avoir véritablement initiée à la botanique, à l'écologie fonctionnelle, aux analyses multivariées et ça ce n'est pas rien !!!! MERCI*

*Merci, **David** pour m'avoir initiée à la mycologie, pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour les grands moments passés en salle myco à déterminer beaucoup de *Penicillium* et peu d'*Aspergillus* !!! Le GRECAN était un grand bol d'air pour moi !!!! MERCI*

*Mes remerciements vont également aux membres du Jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse. Merci à **Christian Huyghe**, directeur de recherche à l'INRA de Lusignan et à **Jacques Guillot**, professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, pour avoir gentiment accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je leur prie de croire en ma profonde reconnaissance pour le temps qu'ils lui auront consacré.*

*Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à **Emmanuelle van Erck**, consultante en médecine sportive équine de l'Université de Liège, d'avoir accepté de juger ce travail.*

Ces trois années de thèse m'ont permis de connaître un grand nombre de personnes que je tiens maintenant à remercier.

*Je tiens, tout d'abord à remercier, le Domaine expérimental du Pin-au-Haras et plus particulièrement, **Yves Gallard** et **Benoît Blanchet** pour avoir fait en sorte que les deux années de production de foin se déroulent le mieux possible. Merci beaucoup à **Benoît Blanchet** avec qui j'ai discuté du protocole, de la mise en place des parcelles, de ce qui était possible ou non de faire, merci pour vos conseils et pour votre présence tout au long des récoltes. Je remercie également tout l'ensemble du personnel qui ont travaillé sur les parcelles (pour la mise en place, la fauche, le fanage, le pressage, le stockage) : **P. Georget, S. Clouard, T. Corbet, M. Aubry, B. Guibout, J. Levallois** et **M. Rouillon**. Je remercie aussi **G. Leau** pour m'avoir fournie les données*

météorologiques. Ces travaux de terrain m'ont appris énormément de choses et surtout que l'on ne peut rien prévoir à l'avance !!! MERCI à vous tous, pour votre aide et votre accueil !!!

*Je remercie le Laboratoire Frank Duncombe pour m'avoir accueillie au cours de cette thèse pour les analyses de mycotoxines et d'endotoxines et pour avoir réalisé toutes les analyses de valeur alimentaire. Merci à **Valérie Bouchard** et à **Rachel Picquet** pour leur présence lors des réunions bilan, mais aussi pour leur gentillesse, leurs conseils et leur aide pour les dosages des mycotoxines. Merci également à **Marilyne Houssin** et à **Virginie Dieuleveux** pour leur disponibilité et leur aide pour les dosages des endotoxines. J'adresse également un merci à **Guy** qui prenait le temps de discuter avec moi et qui a réalisé les analyses de valeur alimentaire.*

*Un grand merci aussi à **Dominique** et à **Patrick** pour leur aide au début de cette expérimentation, notamment lors de la mise en place du dispositif pour la quantification des poussières et pour l'installation de tout le matériel. Je remercie une nouvelle fois, **Dominique**, pour sa présence inconditionnelle sur le terrain notamment au cours des récoltes et pour la tonte des allées mais aussi pour son ingéniosité pour la rampe d'arrosage qui, à l'aide de **Thierry**, a été remarquablement pensée et réalisée.*

*Je tiens également à remercier **Bénédicte** pour son aide technique pour les analyses de poussières car cela m'a bien aidée. Merci aussi pour ta gentillesse, ta volonté de toujours vouloir rendre service et pour ta curiosité.*

*Merci à **Marie-Paule** pour ta gentillesse et ton aide notamment, en master 1 et 2 pour le Dionex, le dosage du nitrate avec les colonnes de Cadmium, mais aussi durant la thèse, par exemple, pour les relevés floristiques au Haras de la Rebourrières. Ce fut une belle journée ensoleillée dans un cadre magnifique !!!!*

*Merci à **Isabelle Mussio** pour m'avoir permis de réaliser le stage de formation à la palynologie organisé par le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA). Merci ce stage était véritablement enrichissant, les pollens sont magnifiques et j'y ai rencontré des personnes vraiment sympathiques, **Anne**, **Dominique**, etc. De plus Mme **Nadine Dupuy** était une enseignante irréprochable lors de cette formation. Un grand merci à **Michel Thibaudon**, directeur du RNSA, pour m'avoir fourni gratuitement le colorant nécessaire pour la confection des lames de reconnaissance des pollens tout au long de cette thèse.*

*Un grand merci à **Raphaël** et à **Anne-françoise** pour leur aide sur le terrain et au laboratoire, leur disponibilité notamment lorsque je les prévenais du jour pour le lendemain et leur gentillesse. Je tiens aussi à vous remercier pour m'avoir accueillie dans votre bureau lors de la fermeture de la FAC, ça a été très gentil de votre part. Le meilleur souvenir avec **Raphaël**, c'est d'avoir arpenté la prairie je ne sais combien de fois pour disposer les jallons autour de chacune des 18 parcelles de 600m² pour faciliter la tonte. Au final on a calculé que l'on avait parcouru environ 4 km. MERCI !!!! Avec **Anne-Françoise**, c'était le jour où nous mettions en place les premières parcelles et que nous devions effectuer les prélèvements de sol. Au moment des prélèvements, un orage éclate, nous n'avions aucun endroit où se loger, nous étions trempés avec nos carrières en ferraille, c'était véritablement sympa !!! Ce n'était pas non plus le jour pour la Kangoo, n'est ce pas ma petite Anne-françoise ? Merci aussi pour tous nos grands moments de discussions, de rigolades, de pause déjeuner. MERCI !!!*

*Un grand merci à **Christine** pour son aide et sa grande gentillesse au cours de ces 5 ans passés au sein de l'UMR EVA. Je n'oublie pas non plus les pauses déjeuner avec toi, Tiphaine et Anne-françoise.*

Remerciements

Un grand merci à ma petite **Lucie** pour sa compagnie pendant ces trois années de thèse malgré les nombreux déménagements de bureaux. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite famille et bonne chance dans ta quête dans le monde du travail. Je ne sais pas toi, mais heureusement que tu étais là, on pouvait se soutenir, pester sur le monde entier quand ça n'allait pas et bien entendu discuter et rigoler !!!

Un grand merci aussi à **Anne-Sophie** pour sa présence, sa grande gentillesse et pour les petites pauses de l'après-midi !!

Je tiens également à remercier **Estelle** avec qui j'ai passé pas mal d'heures en salle myco à faire des tubes de milieux, des identifications. Merci pour ta grande gentillesse, ta patience lorsque j'essayais d'identifier des champignons et pour les parties de rigolades mais également de discussions même très tôt le matin ou tard le soir !

Je remercie également **Caroline** et **Anne** avec qui j'ai passé aussi quelques après-midi en salle myco. Merci pour votre gentillesse et votre aide.

Je tiens à remercier d'anciens thésards avec qui j'ai passé de bons moments.

Un grand merci **Tiphaine** pour ta présence, ta gentillesse et les moments passés à discuter et rigoler. C'était un véritable bol d'air ; Merci également à **Fabien** et à **Bertrand** avec qui j'ai passé d'agréables moments, également, à discuter et à plaisanter !!! Je n'hésitais pas à aller voir un de vous trois lorsque je voulais me changer les idées !!! Merci aussi à **Sébastien** avec qui j'ai partagé le bureau quelques mois, la cohabitation a été sympa et marrante avec toi et Lucie.

J'adresse également une pensée à ma copine de M1 et M2, ma petite **Carole** qui est partie faire une thèse à Avignon sur le pécher. Merci pour ta joie de vivre durant les deux années où l'on s'est supportée. Bonne chance pour ta dernière ligne droite et bon courage !!!

J'adresse également un grand merci à **Annette**, la 4^{ème} personne des bureaux IR074-IR075 (les trois autres se reconnaîtront) dans lesquels je me rendais régulièrement, pour sa gentillesse.

Je tiens également à remercier **Josette, Josiane, Michelle, Xavier, Cindy** pour leur aide précieuse et leur grande gentillesse. J'ai aussi une pensée à **Mr Laîné** (mais « l'on dira plutôt » Philippe) pour sa gentillesse, à **JB** pour m'avoir encadré en M1 avec Servane et pour ses relectures afin de chasser l'implicite !!! Un grand merci à **Emmanuelle** et à **Sylvain** pour leur présence et conseils lors des réunions hebdomadaires, leur disponibilité et pour les relectures de ce manuscrit !!! Merci aussi Emmanuelle pour ton aide sur le terrain lors de la mise en place des taupinières et des crottins et pour ta gaieté. Je garde un bon souvenir d'avoir effectué les sorties 'prairie' des L2 avec toi !!!

Je souhaite bon courage aux autres doctorants : **Maha**, c'est toi la prochaine, (je te souhaite beaucoup de bonheur avec ton 4^{ème} enfant), **Romain, Alexandre, Antonin, Laëtitia et Mustafa**. Courage !!

Je tiens également à souligner la participation de différentes entreprises à ce projet (ECOLIT, BIOMIN, HAYLAGE.BIZ, l'association de Foin de Crau). Je vous en remercie.

J'espère que je n'ai oublié personne, si c'est le cas, je tiens à remercier une nouvelle fois l'ensemble des personnes que j'ai pu rencontrer dans tous les endroits où je suis passée, au cours de ces 3 années de thèse (UMR EVA, GRECAN, LDFD14, Domaine du Pin-au-Haras, Haras de la Rebourserie, Haras de Hoguenet, etc). Merci à vous tous, j'ai appris énormément à vos côtés.

*Pour finir, je tiens à remercier véritablement mes amis pour leur amitié sans faille et leur soutien même à plusieurs centaines de kilomètres (**Micka, Sandrine, Nadia, Sab, Delphine, Guillaume**).*

*Merci à mon **Guino** pour m'avoir supportée et encouragée à ne pas m'apitoyer sur mon sort, durant ces 3 années de thèse !!!! Mais t'inquiète pas ce n'est pas fini, tu vas devoir encore me supporter encore longtemps !!!*

*Je remercie énormément mes **parents** et **Aurélie** (et **Cyril**, sa moitié), pour m'avoir également supportée, non pas ces trois années de thèse, mais ces 26 dernières années. MERCI pour votre soutien et votre présence inestimables !!!! Je remercie aussi tout le reste de la famille et plus particulièrement mes chers grands-parents !!!!*

*Merci à **Jocelyne** et **Jean-Pierre** pour avoir toujours pris des nouvelles du déroulement de la thèse mais aussi aux autres membres de cette grande famille (Jean-philippe, Emilie, Suzy, Jérémy, Arnaud, Lucie et les trois petits bouts) même si je n'étais pas toujours conciliante à vous répondre. Je remercie une nouvelle fois Jean-Pierre pour avoir effectué une relecture de ce manuscrit pour éliminer les dernières fautes de français et de ponctuation.*

Je vous souhaite une agréable lecture à tous.

ABREVIATIONS

-A-

ACN : Acétonitrile

ACP : Analyse en Composantes Principales

ACPVI : Analyse en Composante Principales sur Variables Instrumentales

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AOC : Appellation d'Origine Contrôlée

ARN : Acide ribonucléique

a_w : Activité en eau

-C-

CF : Crude fiber

CFU : Colony Forming Unit

CIRALE : Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections Locomotrices Equines

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CO₂ : Dioxyde de carbone

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CP : Crude protein

CUMA : Coopérative d'Utilisation de Matériel Agricole

CYA : Czapek Yeast Autolysate agar

CYA20 : Czapek Yeast Autolysate agar à 20 % de sucrose

-D-

DAD : Diode array detection

DAS : Diacétoxyscirpénol

DM : Dry Matter

DON : Déoxynivalénol

-E-

EEA : European Environment Agency

ENPH : Ecole Nationale Professionnelle des Haras

EU : Endotoxin Unit

EUP : Eau Ultra Pure

-F-

FB₁ : Fumonisine B₁

FLD : Farmer's Lung Disease

-G-

g : Gramme

G25N : 25 % Glycerol Nitrate agar

GRECAN : Groupe Régional d'études sur le CANcer

-I-

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

-K-

kg : kilogramme

-L-

LAL : *Limulus* Amebocyte Lysate

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire

LDFD : Laboratoire Départemental Frank Duncombe

LPS : Lipopolysaccharides

LTD4 : Leucotriène D4

LTB4 : Leucotriène B4

-M-

m² : mètre carré

m³ : mètre cube

MEA : Malt Extract Agar

mL : mili-Litre

mm : millimètre

MORVR : Maladie Obstructive Récurrente des Voies Respiratoires

MPO : Myélopéroxydases

MS : Matière Sèche

MTBE : Méthylterbutyléther

-N-

NIV : Nivalénol

-O-

O₂ : Oxygène

-P-

PaO₂ : Pression artérielle en O₂

PDA : Potato Dextrose Agar

PR : *Penicillium roqueforti*

PTFE : PolyTetraFluoroEthylene (Teflon filter)

-R-

RAO : Recurrent Airway Obstruction

RNSA : Réseau National de Surveillance Aérobiologique

-S-

SAU : Surface Agricole Utile

SM : Spectrométrie de Masse

SPAOPD : Summer Pasture Associated Obstructive Pulmonary Disease

STH : Surface Toujours en Herbe

-U-

UFC : Unité formant colonie

UI : Unité Internationale

U.V. : Ultra Violet

-Z-

ZEA : Zéaralénone

Remerciements.....	i
Liste des Abréviations.....	v
Tables des matières.....	1

INTRODUCTION GENERALE 8

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE..... 14

I. LA MALADIE OBSTRUCTIVE RÉCURRENTÉ DES VOIES RESPIRATOIRES

(MORVR) 14

I.1 Description..... 14

I.2 Diagnostic..... 14

I.2.1 Examens cliniques..... 14

I.2.2 Examens sub-cliniques 16

I.3 Prévalence 18

I.4 Pathologie 19

I.5 Pathogénie 19

I.6 Etiologie 21

I.6.1 Les poussières 21

I.6.2 Les spores fongiques 22

I.6.3 Les endotoxines 23

I.6.4 Facteurs non spécifiques 24

I.7 Traitements..... 25

I.7.1 Prévention..... 25

I.7.2 Traitements médicaux..... 27

I.8 Impact économique sur le marché équin..... 28

II. LA QUALITÉ SANITAIRE DU FOIN 29

II.1 Les poussières 29

II.2 Les moisissures et mycotoxines..... 30

II.2.1 Définition 30

II.2.2 Ecologie des moisissures 31

II.2.3 Effets sur la santé humaine et animale..... 33

II.2.3.1 Pouvoirs pathogène et allergène des moisissures 33

II.2.3.2 Pouvoir toxinoène des moisissures 34

a. Les aflatoxines 35

b. La gliotoxine 36

c. Les fusariotoxines : les trichothécènes et la zéaralénone 37

d. Les fumonisines 38

e. La toxine PR et la roquefortine C..... 39

II.3 Les endotoxines 40

II.4 Les grains de pollen 40

II.5 Les acariens..... 41

III. LA PRODUCTION DE FOIN.....	43
III.1 Historique	43
III.2 Pratiques culturales	44
III.2.1 <i>La fauche</i>	44
III.2.2 <i>Le conditionnement juste après la fauche</i>	44
III.2.3 <i>Le Fanage</i>	45
III.2.4 <i>L'andainage</i>	45
III.2.5 <i>Le pressage</i>	45
III.2.6 <i>Le stockage</i>	46
III.3 La qualité nutritive des fourrages.....	46
III.3.1 <i>Les principaux éléments constitutifs du foin</i>	46
III.3.2 <i>Effets des pratiques culturales sur la qualité nutritive et l'appétence du foin</i>	48
III.3.2.1 <i>La composition floristique</i>	49
III.3.2.2 <i>Les pratiques culturales et les conditions climatiques</i>	50
III.4 Effets des pratiques culturales sur la qualité sanitaire des foins	53
III.4.1 <i>Les conditions climatiques</i>	53
III.4.2 <i>La contamination par le sol et les effets du taux d'humidité à la récolte</i>	53
III.4.3 <i>Les modes de séchage et de stockage</i>	54
III.4.4 <i>Les additifs de conservation</i>	54
IV. OBJECTIFS DE LA THÈSE	56
MATERIELS & METHODES	60
I. PRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE FOINS	60
I.1 Dispositifs expérimentaux	60
I.1.1 <i>Site d'étude</i>	60
I.1.2 <i>Climat</i>	60
I.1.3 <i>La prairie étudiée</i>	61
I.1.4 <i>Foins plurispécifiques</i>	61
I.1.4.1 <i>Première année de production (2007)</i>	61
a. <i>Mise en place des parcelles</i>	61
b. <i>Traitements appliqués</i>	62
c. <i>Récolte et échantillonnage</i>	64
I.1.4.2 <i>Deuxième année de production (2008)</i>	65
a. <i>Mise en place des parcelles</i>	66
b. <i>Traitements appliqués</i>	66
c. <i>Récolte et échantillonnage</i>	67
I.1.5 <i>Foins monospécifiques</i>	68
I.1.5.1 <i>Espèces récoltées</i>	68
I.1.5.2 <i>Récolte</i>	68
II. MÉTHODES D'ANALYSE.....	69
II.1 Evaluation de la qualité sanitaire	69
II.1.1 <i>Quantification des poussières</i>	69

II.1.1.1 Protocole expérimental	69
II.1.1.2 Essais préliminaires.....	70
II.1.2 <i>Analyse de la microflore fongique des poussières aériennes</i>	71
II.1.2.1 Mise en culture	71
II.1.2.2 Isolement et purification.....	72
II.1.2.3 Identification des espèces fongiques.....	72
a. <i>Identification macroscopique</i>	73
b. <i>Identification microscopique</i>	73
II.1.3 <i>Quantification des mycotoxines</i>	74
II.1.3.1 Extraction dans la matrice foin.....	75
a. <i>Extraction</i>	75
b. <i>Purification</i>	75
II.1.3.2 Dans les poussières aériennes	76
II.1.3.3 Analyse par Chromatographie Liquide Haute performance couplée à un Spectromètre de Masse (CLHP-SM)	76
II.1.4 <i>Extraction liquide des poussières</i>	77
II.1.4.1 Quantification et identification des pollens	77
II.1.4.2 Extraction et quantification des endotoxines	79
II.1.4.3 Evaluation la contamination des poussières de foin par le sol via le contenu en matières minérales	80
II.2 Evaluation de la qualité nutritive	81
II.2.1 <i>Détermination de la masse sèche et minérale</i>	81
II.2.2 <i>Quantification de la cellulose brute</i>	81
II.2.3 <i>Quantification des protéines brutes</i>	81
III. ANALYSES STATISTIQUES.....	82
III.1 Analyses univariées	82
III.2 Analyses multivariées	82
RESULTATS - CHAPITRE I	86
<i>PRÉAMBULE</i>	87
<i>ABSTRACT</i>	88
<i>I. INTRODUCTION</i>	89
<i>II. MATERIALS AND METHODS</i>	91
II.1 Study site and experimental design	91
II.2 Hay quality measurements	92
II.2.1 <i>Quantification of breathable dust</i>	92
II.2.2 <i>Mycological analysis</i>	93
II.2.3 <i>Liquid extraction of dust</i>	93
II.2.3.1 Pollen quantification.....	93
II.2.3.2 Mineral mass of dust and soil contamination	94
II.2.3.3 Extraction and quantification of endotoxins	94
II.2.4 <i>Evaluation of mycotoxin contents in hays</i>	94

II.3 Statistical analysis	95
III. RESULTS.....	96
III.1 Dustiness of hays	96
III.2 Fungal contamination of airborne dust.....	96
III.3 Pollen content.....	97
III.4 Soil contamination.....	98
III.5 Endotoxin content in hays	98
III.6 Mycotoxin contents in hays.....	98
IV. DISCUSSION	99
IV.1 General effects of treatments on hay quality.....	99
IV.2 Mycoflora found in hays and putative involvement in pulmonary diseases	100
IV.3 Endotoxins and mycotoxins	101
IV.5 Pollens	102
V. CONCLUSION.....	102
RESULTATS - CHAPITRE II	105
PRÉAMBULE.....	106
ABSTRACT	108
I. INTRODUCTION.....	109
II. MATERIALS AND METHODS.....	110
II.1 Study site and experimental design	110
II.2 Hay quality measurements	112
II.2.1 Nutritive quality	112
II.2.2 Health quality.....	112
II.2.2.1 Quantification of breathable dust.....	112
II.2.2.2 Microbiological analysis	113
II.2.2.3. Liquid extraction of dust.....	113
a. Pollens quantification	113
b. Mineral mass of dust and soil contamination.....	113
II.2.2.4. Evaluation of mycotoxin contents in hays and dusts	114
a. Extraction and purification of mycotoxins from hay	114
b. Extraction and purification of mycotoxins from dust	114
c. Multi-mycotoxin detection by HPLC-MS	115
II.3 Statistical analysis	115
III. RESULTS.....	116
III.1 Nutritive quality.....	116
III.2 Health quality	116
IV. DISCUSSION	120
IV.1 Nutritive quality	120
IV.2 Health quality	120
IV.2.1 Variation of parameters used for its evaluation	120
IV.2.2 Effect of environmental conditions	122

IV.2.3 <i>Improvements to the drying step</i>	123
IV.2.4. <i>Effect of storage processes on health quality</i>	123
V. CONCLUSION	124
RESULTATS - CHAPITRE III	126
PRÉAMBULE	127
ABSTRACT	128
I. INTRODUCTION	129
II. MATERIALS AND METHODS	130
II.1 Experimental design	130
II.1.2 <i>Experimental production of single-species and classical hays</i>	130
II.1.2.1 Single-species hays	131
II.1.2.2 Classical hay	131
II.1.3 <i>Commercial forages</i>	131
II.2 Hay quality measurements	132
II.2.1 <i>Nutritive quality</i>	132
II.2.2 <i>Health quality</i>	132
II.2.2.1 Quantification of breathable dust.....	132
II.2.2.2 Microbiological analysis	133
II.2.2.3 Evaluation of mycotoxin contents in hays.....	133
II.2.2.4 Liquid extraction of dust.....	134
a. <i>Pollens quantification</i>	134
b. <i>Extraction and quantification of endotoxins</i>	134
II.3 Statistical analysis	135
III. RESULTS	135
III.1 Evaluation of nutritive quality	135
III.1.1 <i>Single-species experimental hays</i>	135
III.1.2 <i>Commercial forages</i>	136
III.2 Evaluation of health quality	136
III.2.1 <i>Single-species experimental hays</i>	136
III.2.2 <i>Commercial forages</i>	138
IV. DISCUSSION	139
IV.1 <i>Effect of floristic composition on hay quality (Figure III-4)</i>	139
IV.2 <i>Comparison of quality between commercial forages (Figure III-5)</i>	141
V. CONCLUSION	142
DISCUSSION GENERALE	145
I. DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODOLOGIE D'ÉVALUATION DE LA QUALITÉ SANITAIRE DES FOURRAGES	145
II. CRITÈRES DE QUALITÉ DES FOINS PRODUITS EN 2007 ET 2008	148

III. EFFETS DES PRATIQUES CULTURALES ET DES CONDITIONS MÉTÉOROLOGIQUES SUR LA QUALITÉ SANITAIRE DES FOURRAGES.....	151
III.1 Le taux d'humidité.....	152
III.1.1 Humidité à la récolte (Chapitre I & II).....	152
III.1.2 Humidité durant la conservation (Chapitre I, II & III).....	153
III.2 Le mode de Séchage (Chapitre I & II)	155
III.3 Les additifs de conservation (Chapitre II)	157
III.4 Les conditions météorologiques (Chapitre I & II)	158
III.5 La période de coupe (Chapitre I et II)	160
III.6 Choix techniques : hauteur de coupe et intensité du pressage	162
III.7 Impact des perturbations d'origine animale : taupinières et pâturage des chevaux	163
IV. EFFETS DE LA COMPOSITION FLORISTIQUE	164
V. QUALITÉ SANITAIRE & QUALITÉ NUTRITIVE : QUELLE RELATION ? (CHAPITRE II & III)	166
VI. SYNTHÈSE.....	166
PERSPECTIVES DE RECHERCHE	169
I. A UNE ÉCHELLE FONDAMENTALE	169
II. A L'ÉCHELLE DE RECHERCHE – DÉVELOPPEMENT	170
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	174
LEXIQUE.....	199
TABLES DES ILLUSTRATIONS	201
1-Tables des Figures	201
2-Tables des Tableaux.....	206
ANNEXES	210

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les prairies constituent une part importante des surfaces fourragères avec 80 millions d'hectares répertoriés en Europe des 25 (EEA, 2005), environ 13 millions d'hectares en France ce qui représente 45% de la SAU (Surface Agricole Utile) et environ 790 000 ha en Basse-Normandie (Agreste, 2000). Les prairies sont des formations herbacées, exploitables sur plusieurs cycles de défoliation-repousse, constituées essentiellement de *Poaceae* et de *Fabaceae* (Huyghe *et al.*, 2005). Elles sont métastables et leur maintien repose sur un équilibre dynamique entre les espèces co-existantes *via* des perturbations, fauche ou pâturage essentiellement (Ramade, 1993).

Les prairies peuvent se répartir en 2 catégories selon leur gestion et donc leurs caractéristiques botaniques : les prairies permanentes et les prairies semées (Touffet, 1982 ; Huyghe *et al.*, 2005 ; Vignau-Lousteau & Huyghe, 2008). Les prairies permanentes ou Surface Toujours en Herbe (STH), constituent l'agrosystème fourrager le plus important avec 9.9 millions d'hectares en France. Parmi les STH, se distinguent les prairies semées depuis 6 à 10 ans, les prairies naturelles non semées dont la production annuelle est d'au moins 1500 unités fourragères et les STH peu productives qui ont une production inférieure au seuil précédent (landes, alpages). Les prairies semées regroupent les prairies dites 'temporaires' et 'artificielles'. Elles sont issues d'un ensemencement de plusieurs variétés sélectionnées. Les prairies temporaires sont caractérisées par une flore prairiale à dominance de *Poaceae* qui constituent environ 75% de la biomasse produite. Leur durée de vie est d'environ 3 à 5 ans. Les prairies artificielles sont constituées exclusivement de *Fabaceae* en culture pure ou en mélange, dont la luzerne tient la première place (Vignau-Lousteau & Huyghe, 2008 ; Huyghe *et al.*, 2005).

D'un point de vue écologique, les prairies sont dites multifonctionnelles. Elles constituent un système de production plus respectueux de l'environnement que les grandes cultures (Huyghe, 2006). Elles constituent la base de l'alimentation des herbivores par le pâturage et la production de fourrages conservés et contribuent aux performances des animaux d'élevage (qualité des produits, performances physiques) (Coulon *et al.*, 1997 ; Vignau-Lousteau & Huyghe, 2008). Les prairies procurent également un certain nombre de « services écologiques » au cœur du développement durable. En effet, elles permettent, comparées aux grandes cultures, de : i) limiter les lessivages et de préserver les sols (Chisci & Zanchi, 1981 ; Benoît *et al.*, 1995) ; ii) limiter l'utilisation des énergies fossiles et l'émission de gaz à effet de serre en accumulant, par exemple, du carbone au même titre que les forêts ; iii) contribuer à augmenter la biodiversité animale et

[¶] Voir lexique page 199

végétale, iv) réguler le régime des eaux et leurs qualités ainsi que le maintien d'une couverture végétale pérenne de part la grande densité des racines qui améliore la porosité et la circulation de l'eau et v) contribuer à la qualité du paysage par la valorisation de terres peu accessibles ou en forte pente par exemple.

Le terme « fourrage » vient du mot pan-germanique du XV^{ème} siècle, *fodar*, qui signifie 'paille' amenée comme source alimentaire mais également sous forme de litière. Le terme « fourrage », signifie « matière première végétale récoltée par l'homme et distribuée pour constituer la ration de base des animaux d'élevage » (Huyghe *et al.*, 2005). Les fourrages sont formés des parties aériennes des plantes fourragères des prairies permanentes ou semées et des cultures de maïs, par exemple. Ces fourrages se distinguent, selon leur mode de conservation et leur teneur en matière sèche (MS), en différentes catégories :

- Fourrages verts contenant 10 à 30% MS tels que l'herbe ou le maïs vert
- Fourrages ensilés contenant 15 à 40% MS tels l'ensilage de maïs ou d'herbe,
- Fourrages enrubannés contenant 40 à 60 % MS
- Fourrages secs contenant 85 à 95% MS tels que les foins et les fourrages déshydratés
- Pailles et rafles telles que les pailles de céréales, de pois et les rafles de maïs.

La consommation directe de fourrages verts, par pâturage constitue le premier mode d'exploitation des surfaces fourragères. D'une part, il contribue à réduire les coûts de production et, d'autre part, il constitue la source d'énergie et de protéines la moins onéreuse comparativement aux ensilages, aux concentrés, etc. (Le Gall *et al.*, 2001). Toutefois, compte tenu du déficit de production en automne et en hiver, les agriculteurs vont également stocker du fourrage sous forme de foins, d'ensilages, d'enrubannés ou encore de fourrages déshydratés au printemps et en été. Ces derniers seront ensuite utilisés lorsque que la production sera plus faible que la demande.

Selon Renaud (2002), les surfaces utilisées, en France, pour constituer ces stocks se répartissent de la façon suivante :

- Trois millions hectares de prairies permanentes, temporaires ou artificielles qui sont exploitées pour produire du foin avec une ou plusieurs coupes au cours de l'année.
- Un million cinq cent mille hectares de maïs qui sont récoltés pour produire de l'ensilage.
- Huit cent cinquante mille hectares de surfaces en *Poaceae* et *Fabaceae* qui sont exploitées et récoltées en voie humide pour produire des ensilages d'herbe ou des enrubannés.

[¶] Voir lexique page 199

Le foin est donc la première forme utilisée pour stocker des fourrages. Il permet une conservation de longue durée en limitant la baisse de la qualité aussi bien nutritive qu'organoleptique qui sont très importantes pour les performances zootechniques (rendement laitier, carné) des animaux d'élevage (bovins, ovins, caprins, équins...) (Coulon *et al.*, 1997 ; Buchin *et al.*, 1998 ; Verdier-Metz *et al.*, 2000 ; Priolo *et al.*, 2001 ; Coulon & Priolo, 2002). Ces qualités nutritive et organoleptique dépendent de plusieurs facteurs à savoir : les pratiques et conditions culturales et la composition floristique. Contrairement à la qualité nutritive, très peu d'attention a été accordée à la qualité sanitaire des foins, qui semble pourtant présenter, en particulier pour l'élevage équin, des conséquences notables.

Les éleveurs et les propriétaires de chevaux sont, actuellement, confrontés à un problème majeur, celui des maladies pulmonaires équines. Ces maladies peuvent entraîner, dans plus de 76% des cas, des pertes de performances du cheval atteint (Van Erck, 2007). L'effectif équin mondial étant d'environ 58,84 millions d'individus dont environ 6,9 millions sont localisés en Europe et environ un million en France (Haras Nationaux, 2003), ces maladies pulmonaires constituent, par conséquent, un enjeu économique de taille.

Parmi ces maladies pulmonaires équines, la plus fréquemment rencontrée est la Maladie Obstructive Récurrente des Voies Respiratoires (MORVR). Cette maladie est similaire à l'asthme chez l'homme. La MORVR est également connue sous les noms de « bronchite chronique », « emphysème » ou encore « heaves » pour les anglo-saxons (Mc Pherson *et al.*, 1978 ; Clarke, 1992). La prévalence[¶] de la MORVR varie de 12 à 80% selon les régions (Hotchkiss *et al.*, 2007 ; Franchini *et al.*, 1998). L'étiologie de la MORVR est encore mal connue mais semble être multifactorielle et d'origine environnementale. Sa prévalence semble associée au type d'alimentation fourni, mais aussi aux conditions de logement de l'animal. Les poussières et autres contaminants contenus dans les fourrages et la litière semblent impliqués dans le déclenchement de la maladie (Clarke, 1992; Benamou *et al.*, 1998; Robinson, 2001; van Erck, 2007). La MORVR se déclenche après une exposition chronique à ces aéroallergènes. Elle touche principalement des chevaux âgés de plus de 5 ans, notamment dans l'hémisphère nord, où ils restent une bonne partie de leur existence dans des box (Léguillette, 2003). Certains constituants des poussières présentes dans les fourrages et la litière tels que des composés animaux (poils, fécès...), des acariens, des bactéries, des fractions de plantes ou de semences, des pollens ainsi que des organismes fongiques comme les moisissures sont incriminés (Robinson, 1997; Schmallenbach *et*

[¶]Voir lexique page 199

al., 1998 ; Chabchoub *et al.*, 2001 ; Robinson, 2001 ; Yiannikouris & Jouany, 2002 ; Pirie *et al.*, 2003). Toutefois le poids de chacun de ces éléments dans l'origine de la MORVR reste inconnu.

La Basse-Normandie, dont 12% de la surface en herbe est uniquement valorisée par le cheval, est la première région française d'élevage équin avec environ 58 000 individus (Pôle de Compétitivité Cheval, 2006) et présente une particularité dans le domaine du cheval pour chacun des départements qui la composent. Le département du Calvados présente un pôle important dans la recherche équine et possède des infrastructures de qualité dans le domaine de la santé et du bien-être du cheval : le CIRALE (Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections Locomotrices Equines), l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) et le Laboratoire Départemental Franck Duncombe dont le département « santé animale » consacre 55% du temps à la santé équine. Le département de l'Orne est spécialisé dans le cheval de course et constitue le berceau d'une des races emblématiques de chevaux de traits, le Percheron. C'est également dans l'Orne que se trouve le Haras National du Pin, classé monument historique, et qui abrite l'Ecole Nationale Professionnelle des Haras (ENPH). Mais l'Orne est avant tout une terre dédiée à la reproduction équine grâce à la Jumenterie du Haras du Pin qui est un centre d'expertise en reproduction équine mais aussi en parasitisme et en alimentation équine/pâturage. La Manche, quant à elle, présente le plus important effectif équin en France. Ce département est également le leader national pour le Cob normand et l'âne du Cotentin et le berceau de la race Selle français essentiellement utilisée dans le cadre d'activités sportives et de loisir. Dans ce contexte, les maladies pulmonaires comme la MORVR constituent une préoccupation pour les éleveurs et propriétaires équins Bas-Normands.

Afin de réduire la prévalence des maladies pulmonaires et plus particulièrement de la MORVR, il paraît alors pertinent d'améliorer la qualité sanitaire des fourrages. L'objectif principal de ce travail de recherche doctoral vise à identifier les facteurs potentiels tels que l'environnement de la prairie, les pratiques culturales ou encore la météorologie, susceptibles d'affecter ou de déterminer la qualité sanitaire des fourrages équins.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une analyse bibliographique portant, dans un premier temps, sur la MORVR et son étiologie, puis dans un second temps, sur la qualité sanitaire des foins. Enfin, dans un troisième temps, la production de foin ainsi que les effets des pratiques culturales sur la qualité du foin seront également présentés.

Ce travail de thèse, financé par la Conseil Régional de Basse-Normandie et constituant une nouvelle thématique de recherche au sein de l'UMR INRA d'Ecophysiologie Végétale,

[¶] Voir lexique page 199

Agronomie et nutrition N.C.S., a nécessité des développements méthodologiques importants. Ce projet a été mis en place dans le cadre d'une collaboration entre deux équipes de l'UMR, l'équipe « Ecologie-Prairie » et l'équipe « Azote » en associant deux autres laboratoires Bas-Normands : le Groupe Régional d'Etudes sur le CANcer (GRECAN) et le Laboratoire Départemental Frank Duncombe. Ce projet a également bénéficié d'une aide financière du Conseil Général du Calvados. Un chapitre « Matériel & Méthodes » suivra le chapitre bibliographique. Les résultats des travaux expérimentaux seront ensuite rapportés au travers des 3 manuscrits de publications suivants :

1- **Effect of agricultural and environmental factors on the hay characteristics involved in equine respiratory disease.** SEGUIN Virginie, LEMAUVIEL-LAVENANT Servane, GARON David, BOUCHART Valérie, GALLARD Yves, BLANCHET Benoit, DIQUELOU Sylvain, PERSONENI Emmanuelle, GAUDUCHON Pascal, OURRY Alain. *Agriculture, Ecosystem and Environment*. In Press

2- **How to improve the nutritive and health quality of hays for horse feeding?** SEGUIN Virginie, GARON David, LEMAUVIEL-LAVENANT Servane, LANIER Caroline, BOUCHART Valérie, GALLARD Yves, BLANCHET Benoit, GAUDUCHON Pascal, OURRY Alain. Prochainement soumise à *Animal Feed Science and Technology*.

3- **Evaluation of health and nutritive qualities of mono-specific and commercial hays in order to reduce equine environmental pulmonary diseases.** SEGUIN Virginie, LEMAUVIEL-LAVENANT Servane, GARON David, BOUCHART Valérie, GALLARD Yves, BLANCHET Benoit, GAUDUCHON Pascal, OURRY Alain. Soumise à *Grass and Forage Science*, le 5 octobre 2009.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La Maladie Obstructive Récurrenente des Voies Respiratoires (MORVR)

Les chevaux peuvent développer, à un moment ou un autre de leur vie, des pathologies respiratoires. Elles se manifestent sous deux formes principales : les infections virales comme la grippe *Influenza* et les maladies pulmonaires inflammatoires chroniques (Robinson, 1997). Ces maladies pulmonaires inflammatoires chroniques sont préjudiciables à la fois au bien-être, à l'exercice et à la performance de l'animal et peuvent conduire, pour les cas les plus aigües, au décès du cheval.

Parmi ces dernières, les maladies des voies respiratoires profondes, telles que la Maladie Récurrenente des Voies Respiratoires (MORVR), représentent 76 % des cas (van Erck, 2007).

I.1 Description

La MORVR est une maladie inflammatoire obstructive des voies respiratoires inférieures des chevaux. Elle est plus fréquente dans l'hémisphère nord où les chevaux sont en écurie une grande partie de leur vie et nourris avec des aliments secs comme du foin. Elle est connue sous différents noms ; le terme le plus communément utilisé par les Anglo-Saxons, est COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) qui a été proposé par Sasse en 1971. Cependant avec l'existence d'une maladie pulmonaire humaine portant le même nom, d'autres noms sont apparus comme bronchite chronique, emphysème pulmonaire, pousse ou encore RAO (Recurrent Airway Obstruction) et heaves.

La MORVR est une maladie inflammatoire environnementale qui se caractérise par une broncho-constriction réversible avec alternance de périodes de rémission et de crises similaires à l'asthme chez l'homme (Lowell, 1990). La MORVR peut apparaître soudainement après une maladie infectieuse respiratoire telle que la grippe *Influenza* (Gerber, 1973).

I.2 Diagnostic

I.2.1 Examens cliniques

Le diagnostic de la MORVR est, tout d'abord, basé sur l'historique de l'animal et sur un examen physique. Cet examen est fondé sur l'observation de signes cliniques, à savoir une toux

[¶]Voir Lexique page 199

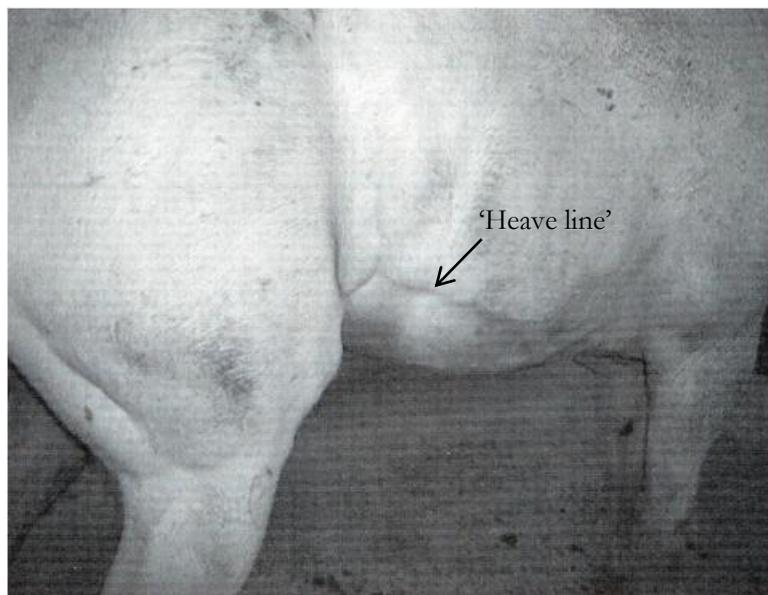


Figure 1 : Photographie montrant une hypertrophie des muscles abdominaux obliques externes appelée 'Heave line', résultant d'un effort expiratoire d'un cheval atteint de MORVR (Léguillette, 2003).

chronique, une intolérance à l'exercice, une détresse respiratoire, des sons respiratoires anormaux et un écoulement nasal (Naylor *et al.*, 1992; Mair et Derksen, 2000; Kramaric *et al.*, 2004). Mais avant d'effectuer un diagnostic, il faut savoir que les signes cliniques dépendent, en général, de l'état d'avancement de la maladie.

Pour les cas peu sévères de MORVR, peu ou pas de signes évidents autres qu'une intolérance à l'exercice sont observables (Robinson, 1996; Mair & Derksen, 2000; Léguillette, 2003). En effet, les chevaux les moins atteints présentent un bilan respiratoire normal au repos et une légère exagération en fin d'expiration accompagnée d'une toux et d'une décharge nasale faible à l'exercice (Mair & Derksen, 2000).

Lorsque la maladie progresse, des sons respiratoires anormaux au repos apparaissent puis augmentent progressivement avec l'avancée de la maladie. La toux ainsi que l'intolérance à l'exercice deviennent de plus en plus marquées. Selon Burrell *et al.* (1996), il faut environ un mois après le déclenchement de la maladie pour que la toux devienne chronique. A ce stade, les signes observables à distance sont une toux, un écoulement nasal, une détresse respiratoire ainsi qu'une perte de poids.

Lorsque la maladie atteint son paroxysme, les signes cliniques deviennent évidents même au repos du cheval. Une simple marche peut entraîner des signes exacerbés. Ces signes sont une toux chronique, la présence de sons respiratoires anormaux (sons trachéens et bronchiques) avec une respiration dite asthmatique marquée (Beech, 1991 ; Robinson, 1996 & 1997), une détresse respiratoire se traduisant par des naseaux extrêmement évasés avec un écoulement nasal persistant et purulent, un effort respiratoire renforcé et une hypertrophisation des muscles abdominaux obliques externes appelée « heave line » (Mc Pherson *et al.*, 1978; Beech, 1991; Robinson, 1996; Mair & Derksen, 2000) (Figure 1). A ce stade, les chevaux changent alors leur stratégie respiratoire par des inspirations rapides et une exhalation forcée prolongée. Pour les chevaux les plus sévèrement touchés, une complète intolérance à l'exercice est observée et parfois le décès du cheval peut survenir.

Cependant les signes cliniques présentent une forte variabilité d'apparition et d'intensité, augmentant ainsi la difficulté du diagnostic. D'une part, la présence de certains signes cliniques est suffisante mais pas nécessaire pour diagnostiquer une maladie respiratoire. D'après une étude réalisée sur 18 chevaux atteints de MORVR, seuls 14 présentaient une toux chronique (Naylor *et al.*, 1992). De même, Kramaric *et al.* (2004) ont observé que parmi 13 chevaux atteints de MORVR, 12 présentaient une toux chronique. Enfin, selon Dixon *et al.* (1995a), qui ont réalisé

[¶]Voir Lexique page 199

Tableau I : Résultats des analyses de la fréquence respiratoire, des gaz du sang, du liquide de lavage bronchoalvéolaire et d'hématologie chez des chevaux sains et atteints de MORVR (Valeur moyenne arithmétique \pm se, t-test) (D'après Kramaric *et al.*, 2004).

		Groupe témoin	Chevaux malades	P
	Fréquence respiratoire	14.0 \pm 0.8	23.1 \pm 1.3	<0.001
Analyses des gaz du sang	PaO ₂ mmHg	106.03 \pm 1.75	89.81 \pm 2.96	<0.001
	PaCO ₂ mmHg	39.72 \pm 0.73	41.75 \pm 0.59	0.040
	pH	7.4322 \pm 0.0044	7.4298 \pm 0.0040	0.700
Analyse du liquide de Lavage bronchoalvéolaire	Macrophages (LAB) (%)	57.1 \pm 6.0	18.1 \pm 3.7	<0.001
	Lymphocytes (LAB) (%)	14.3 \pm 2.0	7.2 \pm 1.0	0.007
	Neutrophiles (LAB) (%)	25.1 \pm 6.4	73.5 \pm 4.8	<0.001
	Eosinophiles (LAB) (%)	3.4 \pm 1.0	1.0 \pm 0.4	0.042
	Basophiles (LAB) (%)	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.863
Analyse sanguine	Leukocytes (sang) (*10 ⁹ /L)	8.12 \pm 0.53	10.87 \pm 0.66	0.004
	Erythrocytes (sang) (*10 ¹² /L)	7.81 \pm 0.30	7.80 \pm 0.215	0.990
	Haemoglobine (sang) (g/L)	128.5 \pm 3.2	133.8 \pm 2.95	0.233
	Neutrophiles (sang) (%)	50.17 \pm 2.22	63.16 \pm 2.00	<0.001
	Lymphocytes (sang) (%)	36.70 \pm 2.18	27.68 \pm 1.95	0.006
	Monocytes (sang) (%)	6.14 \pm 0.43	4.98 \pm 0.37	0.054
	Eosinophiles (sang) (%)	4.52 \pm 1.23	2.18 \pm 0.53	0.103
	Basophiles (sang) (%)	0.68 \pm 0.09	0.47 \pm 0.06	0.056

une étude à plus grande échelle avec 300 cas de MORVR, seuls 71% d'entre eux présentaient une toux chronique. De même pour la détresse respiratoire et l'intolérance à l'exercice (Kramaric *et al.*, 2004) seuls certains chevaux présentaient ces symptômes. L'écoulement nasal est, quant à lui toujours présent mais à des niveaux différents selon l'avancée de la maladie (Kramaric *et al.*, 2004). D'autre part, les signes cliniques se réduisent lorsque les chevaux atteints de MORVR sont au pâturage ou dans un lieu exempt de poussières. Les chevaux deviennent alors asymptomatiques pendant cette période de rémission (Beech, 1991). A l'inverse, les signes cliniques sont exacerbés en hiver lorsque les chevaux retournent au box avec une nourriture et une ventilation inadéquates (Léguillette, 2003). D'après Joubert *et al.* (2002) et Tesarowski *et al.* (1996), il faut, respectivement, un délai de 5 heures à 2 jours pour qu'un cheval sensible présente une détresse respiratoire et une toux chronique en période de rémission après avoir été en contact avec des moisissures contenues dans le foin.

Dans certains cas, l'examen physique peut s'avérer être insuffisant pour le diagnostic précis de la maladie. Il faut alors le coupler à un examen clinique approfondi. De plus, ce couplage présente un autre intérêt. Il permet de distinguer la MORVR d'une autre maladie pulmonaire. Par exemple, une simple radiographie thoracique permet de distinguer la MORVR d'une pneumonie chronique (Léguillette, 2003).

1.2.2 Examens sub-cliniques

Les examens cliniques permettent d'améliorer le diagnostic de la maladie grâce à l'utilisation de matériels médicaux très spécialisés. Etant donné les limites de fiabilité et de sensibilité pouvant être rencontrées, plusieurs méthodes de diagnostic ont été développées.

Tout d'abord, une analyse des gaz du sang peut être réalisée. Elle permet de détecter chez les chevaux malades, une hypoxie c'est-à-dire une diminution de la pression artérielle en O₂ (PaO₂) accompagnée d'une augmentation de la pression partielle en CO₂. Cependant, pour des cas peu sévères de la maladie, cette analyse peut être insuffisante. A un stade peu avancé de MORVR, la PaO₂ est normale au repos mais diminue lorsque le cheval est en exercice. A un stade avancé, cette hypoxie est continue. L'intensité de cette hypoxie dépend alors du stade de la maladie. Parallèlement, une analyse cellulaire du sang peut être effectuée afin de mettre en évidence la maladie par la présence d'une augmentation des leucocytes et des neutrophiles[¶] associée à une diminution des lymphocytes (Kramaric *et al.*, 2004) comme le montre le Tableau I.

L'analyse cytologique des aspérités trachéales constitue une autre méthode de diagnostic. Elle permet d'identifier une inflammation respiratoire par l'augmentation du nombre de

[¶]Voir Lexique page 199

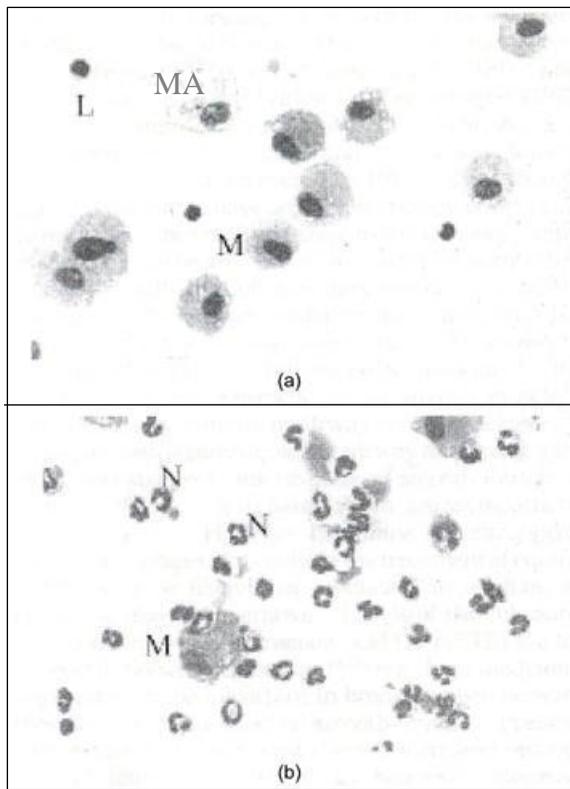


Figure 2 : Cellules du liquide de lavage bronchoalvéolaire: a) Cheval sain: L=lymphocytes; M=macrophage; AM=macrophage actif; b) Cheval atteint de MORVR:N=neutrophiles; M=macrophage phagocytant un neutrophile (D'après Robinson, 1997).

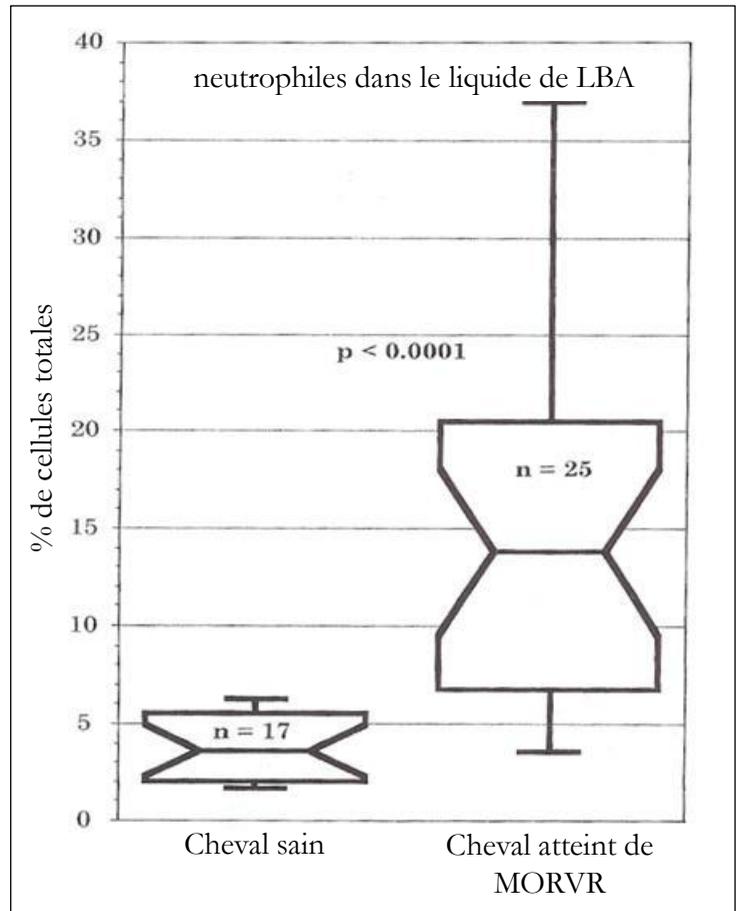


Figure 3 : Pourcentage de neutrophiles chez un cheval sain comparé à un cheval atteint de MORVR (D'après Franchini *et al.*, 1998).

neutrophiles et de la quantité de mucus dans les aspérités trachéales chez des chevaux atteints de MORVR. Cependant cette technique est très discutée. Il semblerait que d'une part, les résultats de la cytologie trachéale ne soient pas corrélés avec ceux de la cytologie des voies respiratoires inférieures (Derksen *et al.*, 1989) et que, d'autre part, les quantités de neutrophiles varient énormément dans ces aspérités rendant l'interprétation des résultats difficile (Beech, 1991). Il est alors préférable de réaliser un Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA) qui est un test beaucoup plus sensible. Cette technique, beaucoup plus invasive pour l'animal, nécessite l'utilisation d'un endoscope assez long (environ 2m) ou d'un tube de lavage broncho-alvéolaire (LBA). L'endoscope ou le tube est introduit dans les voies respiratoires dans lesquelles 300mL d'eau salée sont injectés puis récupérés afin de procéder au comptage de toutes les cellules présentes dans le liquide (Moore, 1996). Chez un cheval sain, les macrophages et les lymphocytes sont majoritaires, les neutrophiles ne représentant que 5% des catégories cellulaires. A l'inverse les neutrophiles augmentent jusqu'à 50 voire 90% pour les chevaux atteints de MORVR (Moore, 1996 ; Franchini *et al.*, 1998) (Figure 2 et 3).

Il existe également un test de la fonction pulmonaire incluant une analyse de sang et une mesure de la pression intra-pleurale. Il aide à mesurer le dysfonctionnement pulmonaire et à surveiller la progression de la maladie. D'après ce test, les chevaux ayant une MORVR avérée présentent un changement important de la pression intra-thoracique durant la respiration pouvant excéder 6 mmHg et une pression partielle en O₂ inférieure à 82 mmHg (McPherson *et al.*, 1978; Mair & Derksen, 2000). Cependant ce test est peu sensible pour détecter des cas peu sévères de MORVR.

Des examens radiographiques peuvent également être utilisés pour diagnostiquer une MORVR. Cependant les anomalies pulmonaires ne sont généralement identifiables que chez des cas avérés de MORVR.

Ces méthodes de diagnostic montrent des limites de sensibilité pour la plupart et ne permettent donc pas de diagnostiquer la maladie dans des cas peu sévères. Plusieurs études ont alors été entreprises afin de développer de nouvelles techniques de diagnostic. Art *et al.* (2006) ont mis en évidence que les myéloperoxydases[¶] (MPO) étaient des marqueurs de présence et d'activation des neutrophiles dans les voies respiratoires. Cette étude réalisée sur 7 chevaux malades et 6 sains, à partir de l'analyse du liquide de LBA, a montré que les chevaux malades se caractérisaient par une augmentation des neutrophiles et des myéloperoxydases par rapport aux chevaux sains. Après 2 mois de pâturage, les chevaux affectés par la MORVR étaient

[¶]Voir Lexique page 199

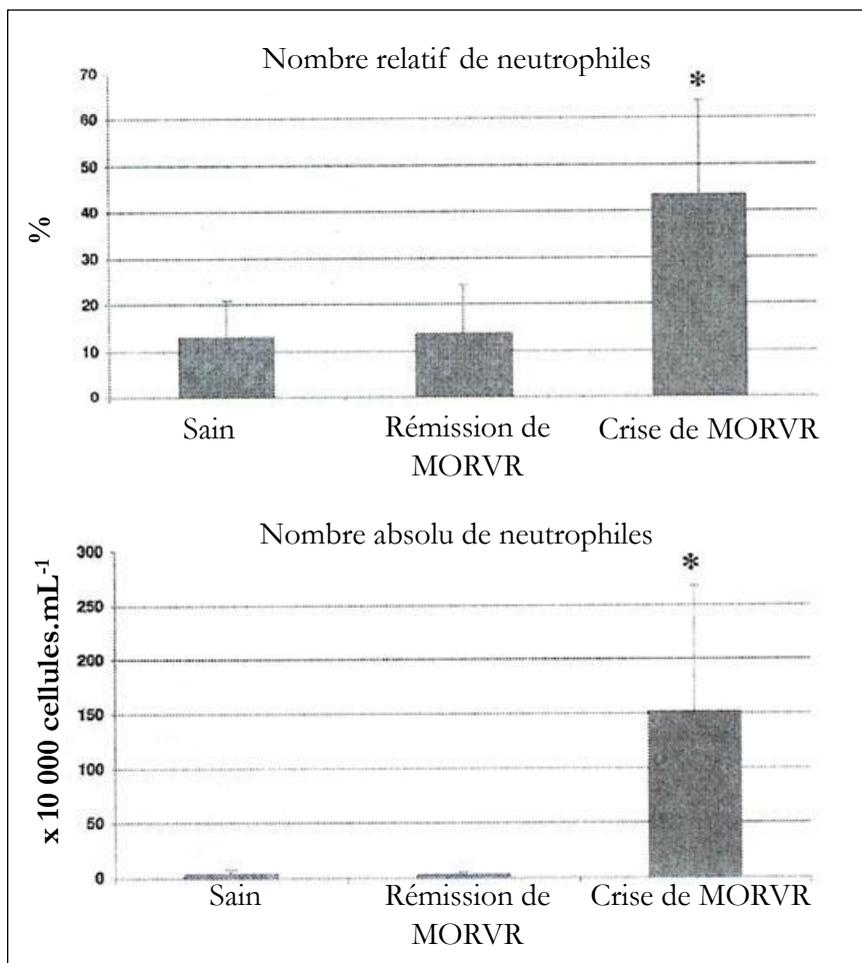


Figure 4 : Nombres relatif et absolu de neutrophiles (moyenne \pm SD) dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire de 6 chevaux sains et 7 chevaux atteints de MORVR en rémission après deux mois au pâturage (RAO rem= MORVR rem) ou en crise. Les astérix indiquent une différence significative ($P<0,05$) (D'après Art *et al.*, 2006).

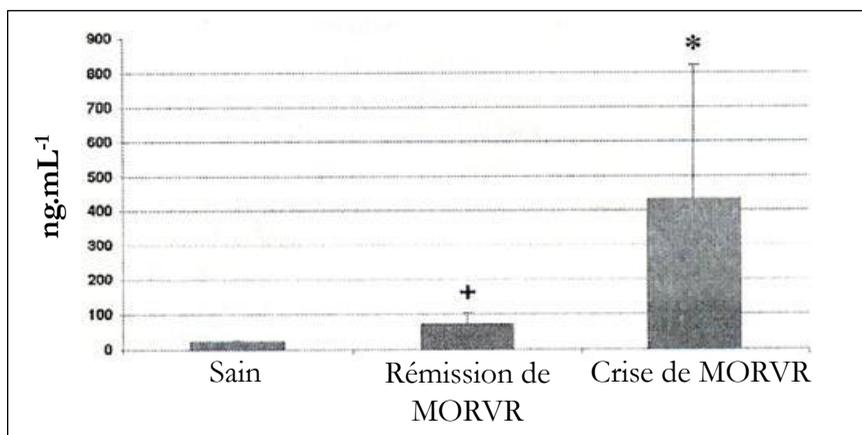


Figure 5 : Concentration en myéloperoxydase (moyenne \pm SD) dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire collecté chez 6 chevaux sains et 7 chevaux atteints de MORVR en rémission après deux mois au pâturage (RAO rem= MORVR rem) ou en crise. (Les astérix indiquent une différence significative ($P<0,05$) (D'après Art *et al.*, 2006).

cliniquement sains, une diminution significative des neutrophiles et des MPO était observée. En revanche, les MPO demeuraient toujours significativement supérieures à celle des animaux sains (Figure 4 et 5). Hall *et al.* (2006) ont, quant à eux, expérimenté l'utilisation d'un test colorimétrique rapide afin de mesurer l'activité chémo-attractant des neutrophiles. Il s'est avéré que l'activité chémo-attractant des neutrophiles chez des chevaux malades était significativement plus élevée que celle des chevaux sains.

Compte tenu de la complexité de diagnostic, de l'absence de structures de recherche vétérinaire adaptée en Basse-Normandie, il n'était pas possible de développer une démarche associant la qualité sanitaire du fourrage et des pathologies respiratoires.

I.3 Prévalence

La MORVR est l'une des maladies pulmonaires équines les plus répandues en Europe et en Amérique du Nord. La prévalence de cette maladie est difficile à estimer de façon précise à cause de la difficulté de diagnostic qui ne permet pas toujours d'identifier les cas peu sévères de MORVR. La prévalence est sous l'influence de plusieurs facteurs tels que l'histoire du cheval ou son environnement. Ainsi selon la méthode de diagnostic employée et le type de cheval, elle peut varier de 14 (Hotchkiss *et al.*, 2007) à 73% (Winder, 1987).

Mc Pherson *et al.* (1978) ont mis en évidence, en mesurant la pression artérielle en O₂ et le changement de pression maximale intrathoracique, que 38% des 100 chevaux et poneys considérés pour l'étude, étaient atteints. Une autre étude Suisse réalisée sur des cadavres équins et par analyses histologiques, quant à elle, a révélé que 73% des 115 chevaux analysés présentaient la maladie respiratoire du système inférieur (Winder, 1987). Bracher *et al.* (1991) ont réalisé une étude de l'incidence de la MORVR, cette fois-ci, sur une population équine suisse. Tous les chevaux ont été examinés par auscultation du système respiratoire, endoscopie des systèmes respiratoires inférieur et supérieur, analyse des gaz du sang et examen cytologique des sécrétions respiratoires. Ces différents examens ont permis de mettre en évidence que 54% des chevaux souffraient de la MORVR. Enfin, une autre étude épidémiologique conduite en Ecosse et en Angleterre, par voie d'enquête auprès d'éleveurs équins associés à leur vétérinaire pour la confirmation du diagnostic, a mis en évidence une prévalence de 14% (Hotchkiss *et al.*, 2007). Cependant cette dernière étude épidémiologique ne permettait pas de détecter les affections légères.

[¶]Voir Lexique page 199

I.4 Pathologie

Chez des chevaux atteints de MORVR, des changements pathologiques sont observés. La sévérité de ces changements est très variable selon les cas et entre les régions touchées des poumons (Beech, 1991 ; Mair et Derksen, 2000). Les lésions observées ne sont pas distribuées de façon homogène. Dans la plupart des cas, les poumons apparaissent grossièrement normaux, pouvant être légèrement lents à se dégonfler ou être sur-gonflés avec une échancrure thoracique sur la surface pleurale viscérale. La couleur rose des poumons peut devenir anormalement pâle à cause de ce sur-gonflement. Si la maladie n'est pas diagnostiquée à temps ou qu'il n'y a pas de suivi médical du cheval atteint, des changements destructifs brutaux des tissus pulmonaires peuvent être observés.

Une analyse histologique des poumons montre généralement une hyperplasie des cellules épithéliales bronchiolaires, une infiltration péri-bronchiale des neutrophiles, des lymphocytes et des cellules plasmatiques ainsi qu'une accumulation des cellules inflammatoires dans la lumière des voies respiratoires. Une inflammation chronique des bronchioles avec quelquefois un sur-gonflement alvéolaire, correspond à l'anomalie histologique la plus conséquente chez un cheval atteint de MORVR. Une évaluation par immuno-histochimie des poumons qui utilise la technique peroxydase/anti-péroxydase permet de constater que le nombre d'immunoglobulines IgA[¶] et IgG[¶] augmente avec la sévérité de la bronchiolite chronique (Winder & vonFellenberg, 1988). Les cellules épithéliales se modifient également dans les petites voies respiratoires. Une perte de granulation et une diminution des cellules de Clara[¶], une augmentation des cellules à gobelet[¶] qui produisent et sécrètent du mucus ainsi qu'une métaplasie[¶] de ces cellules à gobelet sont constatées. Dans certains cas, des fibroses alvéolaires ainsi qu'une nécrose des cellules épithéliales alvéolaires de type I remplacées par de l'épithélium alvéolaire de type II sont observées dans les tissus pulmonaires périphériques (Thurlbeck & Lowell, 1964 ; Gillespie & Tyler, 1969 ; Nicholls, 1978 ; Dixon *et al.*, 1982 ; Kaup *et al.*, 1990 ; Beech, 1991 ; Mair & Derksen, 2000).

I.5 Pathogénie

La MORVR peut apparaître à la suite d'une infection virale, telle que la grippe *Influenza*, ou bactérienne mal soignée (Gerber, 1973 ; Lavoie, 1997 ; Mair & Derksen, 2000). Cependant la

[¶]Voir Lexique page 199

plupart du temps, les véritables causes initiatrices de la maladie restent inconnues et semblent être multifactorielles (Robinson, 1997).

Tout d'abord, c'est une inflammation qui est à la base des signes cliniques et des changements pathologiques qui interviennent chez les chevaux atteints de MORVR. Un cheval affecté par la MORVR peut développer rapidement une inflammation des voies respiratoires inférieures, une broncho-constriction et une sécrétion de mucus lorsqu'il est en contact avec des aéroallergènes. L'inhalation de poussières peut rapidement entraîner une migration des neutrophiles dans les voies respiratoires (Fairbairn *et al.*, 1993) puis une crise. Le délai entre le contact avec la poussière et l'augmentation des neutrophiles dans le liquide de LBA peut être très court, inférieur à 5 h selon McGorum *et al.* (1993) ou encore de 7h selon Fairbairn *et al.* (1993).

Le rôle des neutrophiles dans la pathogénie de la MORVR est très controversé. Leur migration dans les poumons peut résulter d'un mécanisme à la fois non-spécifique et spécifique. Des chevaux sains en contact avec de la poussière peuvent présenter une faible augmentation de la quantité de neutrophiles dans les poumons (Derksen *et al.*, 1985b ; Tremblay *et al.*, 1993 ; Picandet *et al.*, 2002). A l'inverse, chez les chevaux malades, c'est une réponse immunitaire spécifique à des antigènes inhalés qui est observée et qui provoque une production de cytokines[¶] par les macrophages et de lymphocytes alvéolaires qui est, elle-même, suivie d'un afflux de neutrophiles.

Des médiateurs inflammatoires peuvent également avoir un rôle dans la pathogénie de la MORVR. L'activation de la cascade d'acide arachidonique a été démontrée par plusieurs études (Gray *et al.*, 1989 ; 1992a,b,c ; Watson *et al.*, 1990, 1992). Récemment Marr *et al.* (1998) ont mis en évidence que, chez le cheval, les leucotriènes D4 (LTD4), métabolites issus de l'acide arachidonique et hormones intervenant dans les rhumes des foins et l'asthme, entraînaient une obstruction des voies respiratoires dose-dépendante. Les LTB4, quant à eux, induisent le recrutement des neutrophiles aux poumons, suggérant ainsi que ces médiateurs pourraient contribuer à la pathogénie de la MORVR (Mair & Derksen, 2000 ; Léguillette, 2003).

Des broncho-contractions peuvent avoir un rôle dans la pathogénie de la MORVR. La contraction des muscles lisses des voies respiratoires mène à une obstruction diffuse des voies respiratoires chez le cheval. Les systèmes nerveux parasympathique, sympathique et non-adrenergique non-cholinergique jouent un rôle dans les événements menant à la contraction des

[¶]Voir Lexique page 199

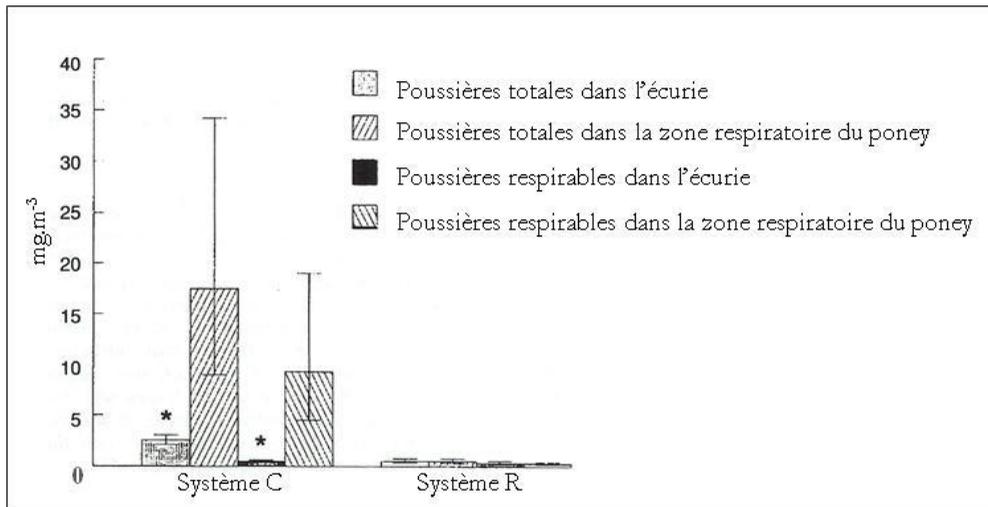


Figure 6 : Concentration des poussières totales et respirables dans l'écurie et dans la zone respiratoire du poney (BZ) sous un système conventionnel comprenant du foin et de la litière de moindre qualité (système C) et un système recommandé pour réduire les maladies pulmonaires équines comprenant des copeaux de bois et des granulés (système R). (D'après Woods *et al.*, 1993).



Figure 7 : Photographies de 3 filtres issus d'un prélèvement d'air dans la zone de respiration du cheval nourrit avec 3 foin différents : a) un cube d'*Alfalfa* (luzerne), b) du foin qualifié de bonne qualité et c) un foin qualifié de mauvaise qualité. (D'après Raymond *et al.*, 1994).

muscles lisses du système respiratoire (Broadstone *et al.*, 1991 ; LeBlanc *et al.*, 1991 ; Wang *et al.*, 1992 ; Yu *et al.*, 1994a et b, Léguillette, 2003).

Un autre facteur, l'accumulation importante de mucus dans les voies respiratoires, contribue à l'obstruction des petites voies respiratoires. Enfin l'inflammation, la bronchoconstriction et l'accumulation de mucus entraînent une obstruction diffuse du système respiratoire mais également une hypoxémie (Nyman *et al.*, 1991).

I.6 Etiologie

L'origine de la maladie reste indéterminée mais semble liée à l'environnement, à l'histoire et à l'alimentation du cheval.

Plusieurs facteurs de risque mis en cause dans l'étiologie de la MORVR, ont été proposés suite à diverses études épidémiologiques (McPherson *et al.*, 1978 ; Hotckiss *et al.*, 2007) comparant des groupes de chevaux sains et des groupes de chevaux malades. L'implication de ces facteurs dans l'étiologie de la MORVR a ensuite été confirmée ou écartée par plusieurs études expérimentales (Fairbairn *et al.*, 1993 ; McGorum *et al.*, 1993 ; McGorum *et al.*, 1998 ; Schmallenbach *et al.*, 1998).

Ces facteurs de risque sont notamment divers constituants des poussières présentes dans l'environnement du cheval, provenant soit du foin, soit de la litière. Ces poussières semblent induire ou amplifier l'inflammation pulmonaire. Toutefois l'importance de chacun des constituants de la poussière, dans l'étiologie de la bronchite chronique, reste inconnue. D'après Robinson (2001), il est probable que l'effet de certains agents allergènes tels que les moisissures soit amplifié par la présence d'autres agents comme les endotoxines de bactéries Gram négatif.

L'implication de quatre agents étiologiques potentiels semble déjà établie (Fairbairn *et al.*, 1993 ; McGorum *et al.*, 1993 ; McGorum *et al.*, 1998 ; Schmallenbach *et al.*, 1998). Ces derniers sont les poussières, les spores fongiques, les endotoxines et des facteurs non spécifiques.

I.6.1 Les poussières

Les chevaux en écurie étant généralement en contact avec de la poussière, la principale hypothèse émise incrimine les poussières (Clarke & Madelin, 1987 ; Woods *et al.*, 1993 ; Robinson *et al.*, 1996). Ces poussières générées par du foin et/ou de la litière de moindre qualité sont constituées de spores fongiques, de bactéries Gram négatif produisant des endotoxines,

[¶]Voir Lexique page 199

Tableau II : Espèces fongiques et actinomycètes isolés à partir de plusieurs sources de foins et litières (D 'après Clarke & Madelin, 1987).

Champignons	Matériels analysés					
	Foin	Journaux	Tourbe	Copeaux	Pailles	Tissus
<i>Absidia corymbifera</i>	◆					◆
<i>Acremonium</i> species	◆			◆	◆	
<i>Alternaria alternata</i>	◆			◆	◆	
<i>A tenuissima</i>	◆					
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	◆					
<i>Aspergillus amstelodami</i>	◆					
<i>A candidus</i>	◆		◆	◆		
<i>A flavus</i>	◆					
<i>A fumigatus</i>	◆			◆	◆	
<i>A glaucus</i> group	◆					
<i>A nidulans</i>	◆				◆	
<i>A niger</i>	◆				◆	
<i>A terreus</i>						
<i>A versicolor</i>						
<i>Blastobotrys nivea</i>	◆					
<i>Botrytis cinerea</i>				◆		
<i>Chaetomium globosum</i>	◆					
<i>Cladosporium cladosporioides</i>				◆		
<i>C herbarum</i>	◆	◆		◆	◆	◆
<i>C macrocarpum</i>					◆	
<i>C sphaerospermum</i>						
<i>Cunninghamella echinulata</i>	◆					
<i>Curvularia</i> species	◆				◆	
<i>Doratomyces microsporus</i>				◆		
<i>D steomonitis</i>	◆					
<i>Epicoccum purpurascens</i>	◆				◆	
<i>Fusarium culmorum</i>	◆					
<i>Fusarium poae</i>	◆					
<i>Geotrichum candidum</i>	◆					
<i>Harzia acremonioides</i>	◆					
<i>Helminthosporium</i> species					◆	
<i>Malbranchea sulfurea</i>	◆					
<i>Mucor plumbeus</i>	◆				◆	
<i>M racemosus</i>				◆		
<i>M</i> species	◆	◆		◆	◆	
<i>Paecilomyces variotti</i>				◆		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	◆			◆		
<i>P citrinum</i>	◆			◆		
<i>P crustosum</i>	◆					
<i>P frequentans</i>	◆					
<i>P piceum</i>	◆					
<i>P</i> species	◆	◆				◆
<i>Rhizomucor pusillus</i>	◆			◆	◆	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	◆					
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	◆				◆	
<i>Sporobolomyces</i>	◆				◆	
<i>Sporotrichum</i>	◆			◆	◆	
<i>Stachybotrys chartarum</i>	◆					
<i>Stemphylium botryosum</i>	◆					
<i>S globuliferum</i>	◆				◆	
<i>S sarciniforme</i>	◆				◆	
<i>Thermoascus crustaceus</i>	◆					
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	◆				◆	
<i>Torula herbarum</i>	◆				◆	
<i>Trichoderma viride</i>	◆				◆	
<i>Trichothecium roseum</i>	◆				◆	
<i>Ulocladium atrum</i>	◆	◆				
<i>Walleria sebi</i>	◆				◆	
Yeasts, various						
Actinomycetes						
<i>Micropolyspora faeni</i>	◆			◆	◆	
<i>Saccharomonospora viridis</i>	◆				◆	
<i>Streptomyces</i> species	◆		◆	◆	◆	
<i>Thermoactinomyces thalophilus</i>	◆				◆	
<i>T vulgaris</i>	◆			◆	◆	

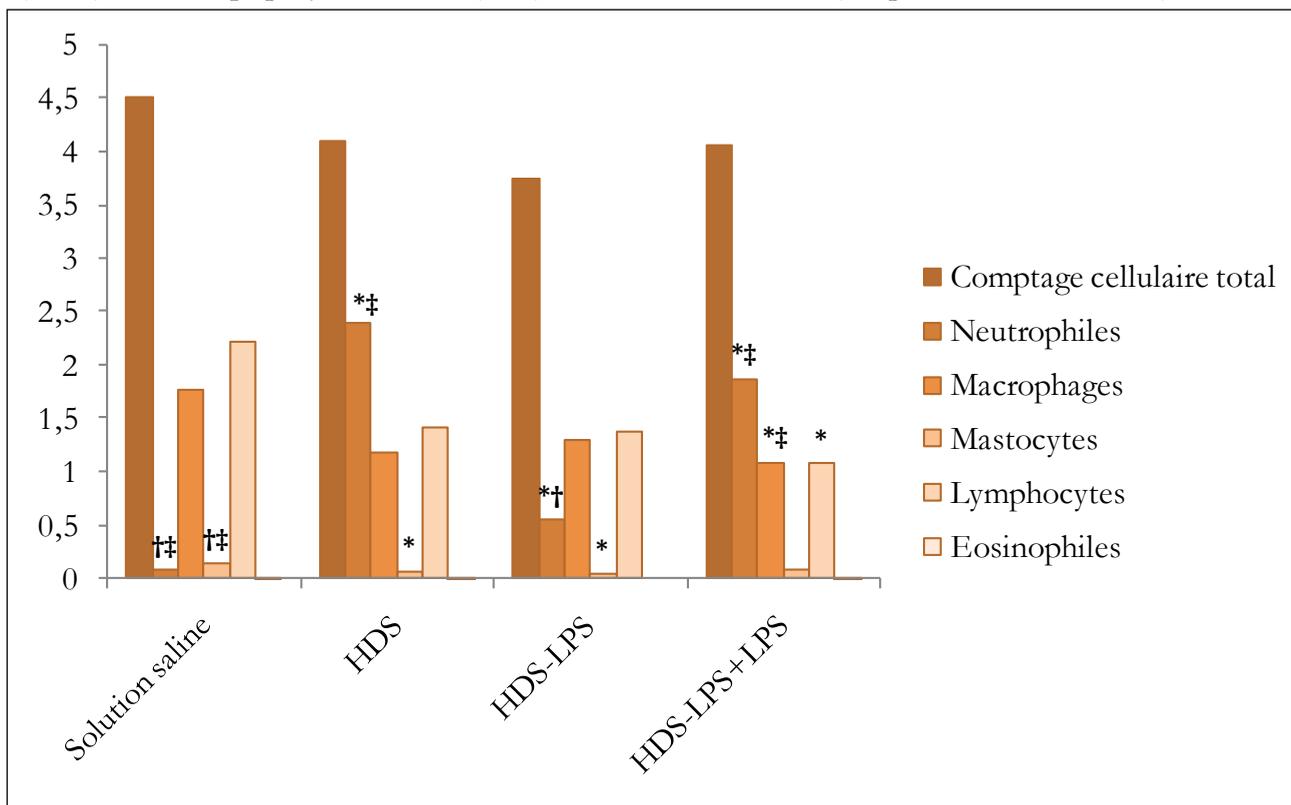
d'acariens, d'insectes, de débris végétaux ou animaux ou encore de fèces (Mansmann *et al.*, 1975 ; Campbell *et al.*, 1989 ; Robinson *et al.*, 1996). Elles peuvent rapidement entraîner une hypersensibilité du cheval atteint de MORVR et ainsi engendrer une réponse inflammatoire accompagnée d'une obstruction des voies respiratoires (Derksen *et al.*, 1985 ; McGorum *et al.*, 1993). Les poussières sont régulièrement remises en suspension dans l'air par les mouvements du cheval, lorsqu'il se nourrit, par exemple. D'après Woods *et al.*, (1993), dans le box, les poussières se concentrent principalement autour du nez du cheval (Figure 6) et plus la qualité du foin est mauvaise, plus cette concentration augmente autour de la zone respiratoire du cheval (Raymond *et al.*, 1994) (Figure 7).

1.6.2 Les spores fongiques

La seconde hypothèse retenue pour l'étiologie de la MORVR est fondée sur le rôle des micro-organismes et notamment des champignons. En effet, un foin conservé avec 20 à 30% d'humidité est riche en spores de moisissures et d'actinomycètes comme l'exposent Clarke & Madelin (1987). Le foin, comparé à différentes litières comme les copeaux de bois, la paille ou des journaux, présente une plus grande diversité fongique (Tableau II). Une cinquantaine d'espèces fongiques peuvent être identifiées (Tableau II). Parmi ces espèces fongiques, une moisissure, *Aspergillus fumigatus*, et 2 actinomycètes thermophiles, *Thermoactinomyces vulgaris* et *Faenia rectivirgula* sont présentes en grande quantité dans les foins récoltés et stockés dans des conditions humides (Yiannikouris & Jouany, 2002). Leurs spores ont un diamètre aérodynamique de 0.5 à 3 µm ce qui leur permet d'être facilement inhalés par les chevaux et transportés dans les voies respiratoires les plus profondes. Elles sont alors reconnues comme corps étrangers par le système immunitaire de l'animal et elles induiraient ou du moins exacerberaient les bronchites chroniques (Schmallenbach *et al.*, 1998). Plusieurs études ont été réalisées afin de confirmer l'hypothèse de l'intervention de ces trois espèces dans l'étiologie de la MORVR. Mc Gorum *et al.* (1993) et Fairbairn *et al.* (1993) ont étudié l'effet d'une exposition naturelle aux différents aéro-allergènes et une exposition avec l'une des 3 espèces incriminées. Ces essais étaient réalisés à la fois sur des chevaux sains et des chevaux affectés par la MORVR logés dans un box. Certains chevaux étaient exposés à du foin de moindre qualité et d'autres étaient uniquement exposés à l'une des 3 espèces, à savoir, *Aspergillus fumigatus*, *Thermoactinomyces vulgaris* et *Faenia rectivirgula*. Un dysfonctionnement pulmonaire a été observé chez les chevaux malades, quelques heures après l'exposition naturelle. Après 5h, une hypoxie ainsi qu'une augmentation du nombre de neutrophiles dans le liquide de LBA ont également été observées chez les chevaux malades. Les chevaux sains, n'ont, quant à eux, montré aucun signe de MORVR. Seule une exposition à

[¶]Voir Lexique page 199

Figure 8 : Nombre de cellules du liquide de lavage broncho-alvéolaire chez des chevaux malades, 6h après l'inhalation d'une solution saline servant de témoin, de Hay Dust Suspension (HDS), HDS-Lipopolysaccharide (LPS) et HDS-LPS + LPS (D'après Pirie *et al.*, 2003).



- Statistiquement différents de la solution saline ($P < 0.05$);
- † Statistiquement différents de HDS ($P < 0.05$);
- ‡ Statistiquement différents de HDS-LPS ($P < 0.05$).

Aspergillus fumigatus ou à *Faenia rectivirgula*, a entraîné, chez les chevaux atteints, une augmentation des neutrophiles dans le liquide de LBA. Cependant, cette neutrophilie est moins sévère que celle observée lors d'une exposition naturelle et n'est pas accompagnée d'un changement de la fonction pulmonaire. La MORVR semble donc résulter d'une hypersensibilité pulmonaire à des antigènes spécifiques contenus dans le foin et la paille, avec des effets synergiques de plusieurs aéroallergènes.

1.6.3 Les endotoxines

La troisième hypothèse sur l'étiologie de la MORVR fait intervenir les endotoxines présentes en grande concentration dans les écuries. Une corrélation a été mise en évidence entre les concentrations en poussière et en endotoxines (Mc Gorum *et al.*, 1998). Selon Berndt *et al.* (2008), les chevaux en écurie seraient exposés à une concentration en endotoxines 8 fois plus élevée que ceux au pâturage.

Les caractéristiques clinico-pathologiques de la MORVR ressemblent à celles de maladies pulmonaires engendrées par des endotoxines chez d'autres espèces. Chez l'homme, par exemple, elles contribuent au développement d'un certain nombre de maladies pulmonaires telles que l'obstruction aiguë des voies respiratoires (Lundholm *et al.*, 1986 ; Olenchock *et al.*, 1986) ou encore elles sont un déterminant important dans la sévérité de l'asthme chez l'homme associé à une allergie aux acariens (Michel *et al.*, 1996). Enfin, l'inhalation des lipopolysaccharides solubles qui sont des complexes toxiques situés dans la membrane externe des bactéries Gram négatif, induit à court terme quelques symptômes de la MORVR chez des chevaux sensibles (Pirie *et al.*, 2003). Les endotoxines pourraient donc avoir un rôle dans le déclenchement de la MORVR soit directement par l'inhalation d'une forte concentration en endotoxines soit indirectement en ayant des effets synergiques sur les autres aéroallergènes. Pirie *et al.* (2003) ont mis en évidence un effet pro-inflammatoire synergique entre les particules de poussières et les endotoxines inhalées chez des chevaux atteints de MORVR. Des chevaux sains et d'autres affectés par la MORVR ont reçu des inhalations de suspension de poussières de foin avec ou sans lipopolysaccharides (LPS). Les réponses fonctionnelles et inflammatoires des voies respiratoires pour chacun des tests ont été mesurées. Une atténuation de la neutrophilie ainsi qu'une suppression du dysfonctionnement des voies respiratoires ont été observées suite à l'inhalation de la suspension de poussières de foin sans LPS, chez les chevaux sensibles à la MORVR. Si des LPS sont ensuite ajoutées, les symptômes réapparaissent (Figure 8). Ceci confirme donc que l'atténuation des symptômes est due spécifiquement à l'absence des endotoxines. Cependant, il semble que l'amplitude d'altération

[¶] Voir Lexique page 199

de la réponse des voies respiratoires après une inhalation de poussières exemptes d'endotoxines suivie d'un rajout de LPS soit plus élevée que celle qui pourrait être attribuée uniquement aux endotoxines. Par conséquent l'activité des LPS doit être augmentée par d'autres constituants des poussières. Pirie *et al.* (2003) ont ensuite testé la contribution des endotoxines à la réponse inflammatoire et fonctionnelle pulmonaire après inhalation par des chevaux affectés par la MORVR, d'extraits d'*Aspergillus fumigatus*. Il s'est avéré que la réponse était amplifiée lorsque les extraits de moisissures contenaient des LPS. Les endotoxines semblent donc avoir un rôle dans l'inflammation et le dysfonctionnement pulmonaire notamment en amplifiant l'effet d'autres constituants de la poussière (Robinson, 2001 ; Pirie *et al.*, 2003).

1.6.4 Facteurs non spécifiques

Enfin la quatrième hypothèse fait intervenir d'autres facteurs environnementaux, mais cette fois-ci, non spécifiques (poussières inorganiques, courants d'air froid ou sec), pouvant jouer un rôle important dans l'évolution de la maladie et notamment dans la sévérité du dysfonctionnement pulmonaire chez des chevaux présentant les symptômes de la bronchite chronique (Robinson, 2001).

L'effet de ces différents constituants peut être influencé par d'autres facteurs comme l'environnement, l'histoire du cheval ou une susceptibilité génétique. Cette dernière a été suggérée par Marti *et al.* (1991). Ils ont observé que des poulains issus de 2 parents affectés par la MORVR étaient plus sujets à déclarer la maladie que des poulains nés de parents sains. La MORVR semble donc avoir une origine multifactorielle avec une base génétique. De plus, d'après des travaux effectués par Ward & Couëtil (2005), la concentration d'agents allergènes dans l'air ambiant et les facteurs climatiques expliqueraient 30% de la variance de la prévalence de la maladie chez les chevaux. Couëtil & Ward, en 2003, ont suggéré un lien entre le sexe « femelle » et la maladie. McPherson *et al.* (1978) et Hotchkiss *et al.* (2007), ont réfuté cette hypothèse et ont mis en évidence que la probabilité d'avoir la MORVR augmentait plutôt avec l'âge du cheval. En effet, cette maladie est plus fréquemment diagnostiquée chez des chevaux âgés de plus de 5 ans (Hotchkiss *et al.*, 2007 ; McPherson *et al.*, 1978). McPherson *et al.* (1978) ont également supposé qu'un cheval de course hippique ou de selle était plus sensible à la MORVR que les autres types de chevaux. Enfin, une exposition à un environnement urbain ainsi qu'une infection respiratoire durant sa jeunesse semblent également augmenter la probabilité pour un cheval de contracter la MORVR (Hotchkiss *et al.*, 2007).

[¶] Voir Lexique page 199

I.7 Traitements

L'origine exacte de la MORVR étant incertaine, les traitements ne sont utilisés que pour traiter ou réduire les symptômes. Le traitement prescrit est individualisé car il dépend à la fois de la sévérité et de la chronicité de la maladie, des capacités à réduire les aéro-allergènes présents dans l'environnement du cheval, du type et du dosage des médicaments requis et du travail du cheval (Robinson, 1997). Selon Thomson & McPherson (1984), le succès du traitement réside dans le contrôle de l'environnement des chevaux malades. Ainsi pour réduire les symptômes de la MORVR, il faut tout d'abord effectuer de la prévention en réduisant la quantité d'aéro-allergènes dans l'environnement du cheval puis, dans un second temps, d'effectuer un traitement médical.

I.7.1 Prévention

Le meilleur traitement pour lutter contre la MORVR est la réduction à l'exposition à des aéro-allergènes (poussières, moisissure, endotoxines) mais aussi des polluants aériens comme l'ammoniac issu des déjections équinées (Thomson & McPherson, 1984 ; Mair & Derksen, 2000). L'ammoniac est un gaz toxique pouvant irriter les yeux et les muqueuses des membranes respiratoires et engendrer une maladie respiratoire infectieuse (Pickrell, 1990).

Il faut, par conséquent, contrôler de façon optimale l'environnement du cheval (ventilation, nourriture) (Jackson *et al.*, 2000 ; Robinson & Wilson, 2001). Le mode de gestion optimal pour le cheval atteint de MORVR serait de le mettre totalement au pâturage sans contact avec du foin ou de la paille limitant ainsi l'exposition aux poussières mais cela n'est évidemment pas toujours possible dans l'hémisphère Nord.

Le foin est considéré comme la source la plus importante de poussières et de moisissures. L'éliminer de la ration ne semble pas raisonnable puisqu'il est à la base de l'alimentation du cheval. Des fourrages alternatifs sont maintenant proposés aux propriétaires équins. Les ensilages ou les enrubannés qui sont des fourrages conservés humides présentent des taux de poussières et de contamination fongique nettement inférieurs à celle du foin (Raymond *et al.*, 1997 ; Vandemput *et al.*, 1997). Cependant il faut que l'ensilage soit de très bonne qualité car les chevaux sont très sensibles à la toxine de *Clostridium botulinum*. Leur utilisation dans l'alimentation du cheval prend une place de plus en plus importante (Billysson, 2002 ; Holmquist & Müller, 2002 ; Schwarz *et al.*, 2005). L'utilisation de granulés est également en extension. Selon Vandemput *et al.* (1997), les granulés de luzerne sont significativement moins poussiéreux et contaminés par des spores fongiques. Woods *et al.* (1993) ont comparé deux systèmes de gestion sur des poneys : l'un

[¶]Voir Lexique page 199

conventionnel avec du foin et de la paille de moindre qualité et l'autre recommandé pour réduire les maladies pulmonaires avec des copeaux de bois et des granulés. Il s'est avéré que le système conventionnel était le plus poussiéreux et contaminé par les organismes fongiques. Cette même étude a mis en évidence que la zone respiratoire autour du nez du poney était nettement plus contaminée que dans le reste de l'étable.

Une autre pratique assez ancienne pour réduire la quantité de poussières est le trempage du foin dans l'eau avant de le distribuer aux chevaux. Moore-Colyer (1996) a montré qu'un trempage pendant 30 min réduisait le contenu en poussière de 90%. Blackman & Moore-Colyer (1998) ont mis en évidence qu'un trempage de 10 min ou un foin exposé à la vapeur durant 80 min réduisait de 93% le contenu en poussières. Cependant durant un trempage, le foin perd des minéraux (phosphore, potassium, magnésium, sodium et cuivre) (Moore-Colyer, 1996 ; Blackman & Moore-Colyer, 1998).

Le changement de type de litière apparaît également comme une solution intéressante pour la réduction de la production de poussières. Comparé à de la paille de blé, l'utilisation de paille ou de papier conditionnés sous forme de granulés, des copeaux de bois et de litière à base de carton, par exemple, réduit significativement la quantité de poussières mais également les aéro-allergènes (Ward *et al.*, 2001 ; Fleming *et al.*, 2008). Cependant selon Vandenput *et al.*, 1997, la paille de très bonne qualité resterait, tout de même, moins poussiéreuse que les copeaux de bois.

Dans le contrôle de l'environnement du cheval, la maîtrise de la ventilation est aussi importante que le changement de fourrages. Une bonne ventilation permet à la fois de renouveler l'air de l'écurie et de réduire les poussières et les concentrations des gaz tels l'ammoniac. Dans les vieilles écuries, les fenêtres et portes doivent être ouverte le plus possible. Selon Dixon *et al.* (1995b), il faut au moins une ouverture de 0.20m² dans le fond de l'écurie et une demi-porte ouverte à l'opposé.

Pour des cas faibles ou modérés de MORVR, la gestion de l'environnement du cheval est suffisante. Pour des cas sévères de MORVR, il est préférable d'associer cette gestion à un traitement médical.

[¶] Voir Lexique page 199

1.7.2 Traitements médicaux

Les principaux médicaments employés pour la MORVR sont des bronchodilatateurs et des corticostéroïdes que nous ne citerons que rapidement, puisque cela sort assez nettement de notre projet.

Les bronchodilatateurs utilisés se divisent en 3 groupes : les anticholinergiques (atropine, le glycopyrrolate, l'ipratropium bromide), les sympathomimétiques (agonistes β 2-adrenergiques comme le clenbuterol) et les inhibiteurs des phosphodiesterases (aminophylline).

Les anticholinergiques sont utilisés lors d'exacerbations aiguës de MORVR, pour soulager les signes cliniques engendrés par les broncho-contractions (Broadstone *et al.*, 1988 ; Mair & Derksen, 2000 ; Léguillette, 2003) mais également en recherche clinique pour évaluer la réversibilité de l'obstruction pulmonaire (Ducharme & Fubini, 1983 ; Pearson & Riebold, 1989).

Les agents sympathomimétiques (le clenbutérol, terbutaline, pirbutérol, l'albutérol) entraînent des bronchodilatations par stimulation des récepteurs β 2 dans les petites et grandes voies respiratoires.

Les inhibiteurs des phosphodiesterases tels que la caféine, théobromine ou théophylline, facilitent la bronchodilatation en inhibant la rupture du AMP cyclique intracellulaire dans les muscles lisses des voies respiratoires.

Les corticostéroïdes utilisés sont le prédnisolone, le dexaméthasone et le beclométhasone. Ils permettent de réduire efficacement l'inflammation des voies respiratoires (Barnes & Pedersen, 1993 ; Barnes, 1996).

D'autres traitements médicaux existent tels que l'utilisation de cromoglycate de disodium, de mucolytiques, d'immunothérapie ou encore de molécules antimicrobiennes.

Le cromoglycate de disodium est un agent stabilisant des mastocytes qui est un traitement prophylactique efficace chez certains chevaux. Il est plus particulièrement utilisé lorsque l'exposition à des poussières, du cheval affecté, est inévitable comme par exemple lors d'un voyage (Thomson & McPherson, 1981 ; Mair & Derksen, 2000). Les mucolytiques (l'acétylcystéine, dembrexine ou bromhexine) sont utilisés dans le traitement de la MORVR afin de fluidifier les voies respiratoires engorgées par du mucus et faciliter ainsi la respiration. L'immunothérapie peut être également employée dans certain cas, afin de produire une hyposensibilisation aux allergènes incriminés (Beech & Merryman, 1986). Cependant, les difficultés associées à l'identification des allergènes importants dans la MORVR et les multiples allergies possibles chez un cheval limitent l'efficacité du traitement. Les médicaments antimicrobiens comme la procaine pénicilline G ou la sulphadiazine-triméthoprime interviennent lorsqu'une infection bactérienne secondaire des petites voies respiratoires apparaît chez des

[¶]Voir Lexique page 199

chevaux atteints de MORVR. L'isolat bactérien le plus communément trouvé est alors *Streptococcus zooepidemicus*.

I.8 Impact économique sur le marché équin

De par la baisse de performance qu'elles peuvent engendrer et par leur forte prévalence dans l'Hémisphère Nord, les maladies pulmonaires équines ont un impact économique incontestable sur le marché équin. Cependant aucune étude n'est, à notre connaissance, disponible à ce sujet. En effet, entre les coûts des traitements médicaux ou des changements dans la gestion de l'environnement du cheval (nourritures, ventilation,...) entrepris par les éleveurs, elles peuvent vite devenir un réel problème. A ce surcroît, il faudrait par ailleurs ajouter les pertes financières liées au fait que le cheval de compétition puisse être retiré ponctuellement ou définitivement du travail. Actuellement, la plupart des études réalisées mettent en évidence l'importance du choix d'un fourrage et d'une litière exempts de poussières pour palier ces maladies pulmonaires équines et d'une bonne ventilation dans l'écurie (Vandenput *et al.*, 1997 ; Dixon *et al.*, 1995b) mais aucune ne fait référence en amont à des possibilités d'amélioration de la qualité sanitaire des fourrages et des litières. Il existe, donc, un réel besoin, pour les éleveurs, de trouver des solutions d'amélioration de la qualité sanitaire.

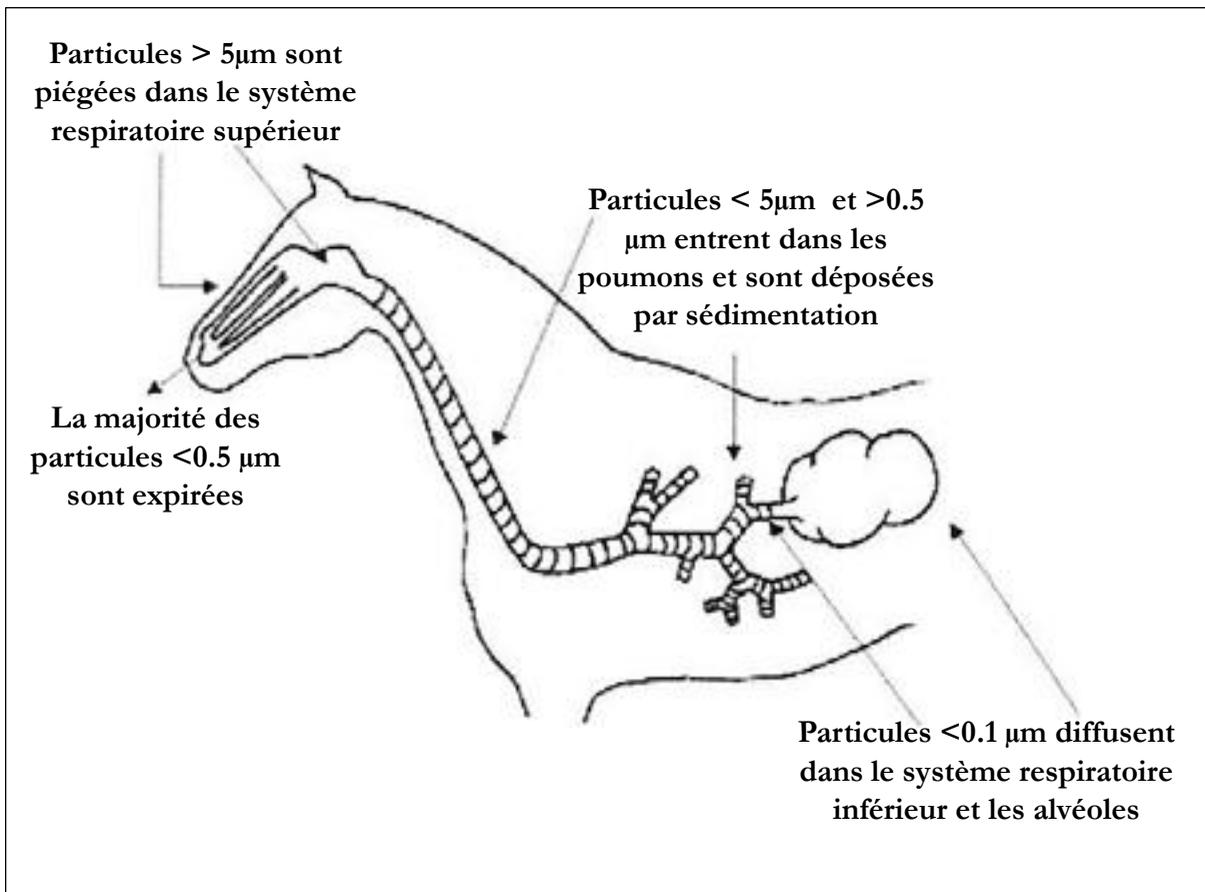


Figure 9 : Schéma représentant le système respiratoire du cheval ainsi que le niveau de pénétration de chacune des fractions de poussière (D'après Art et al., 2002).

II. La qualité sanitaire du foin

La qualité sanitaire d'un fourrage peut être évaluée par la présence et la quantité de plusieurs composés connus pour avoir des effets directs sur la santé animale et humaine : poussières, débris d'origine animale ou végétale, fèces, moisissures, mycotoxines, pollens, endotoxines et acariens (Cargill, 1999). Ils sont regroupés sous le nom de bio-aérosols. Trois groupes de maladies sont associés à l'exposition de ces bio-aérosols : Les maladies infectieuses liées aux champignons et bactéries, les maladies respiratoires liées aux moisissures, pollens, acariens, endotoxines et les cancers liés aux mycotoxines. Les maladies infectieuses et respiratoires sont les plus communément rencontrées (Brain & Valberg, 1979).

II.1 Les poussières

Les poussières sont des particules en suspensions dans l'air. La taille des poussières varie de 0.1 μm à plus de 100 μm (Cargill, 1999). Les poussières proviennent de l'animal, lui-même, avec sa peau et ses poils mais aussi de la nourriture, de la litière et de ses excréments (Collins & Algers, 1986).

Egalement appelées 'particules aériennes', les poussières sont un mélange de matériel organique et inorganique. Parmi le matériel organique appelé 'bio-aérosol', se trouvent des bactéries, des champignons (spores, hyphes), des toxines fongiques, les mycotoxines, et bactériennes, les endotoxines, des fèces, des débris d'origine animale ou végétale ainsi que des pollens (Raymond *et al.*, 1997 ; Cargill, 1999).

Les particules de poussières sont réparties en trois classes selon leur taille et par conséquent selon leur capacité à pénétrer, de façon plus ou moins profonde, dans le système respiratoire (Cargill, 1999) (Figure 9):

- Poussières de la fraction des voies respiratoires supérieures : particules solides de 10 à 20 μm de diamètre. Lorsqu'elles sont inhalées, ces particules ne peuvent pénétrer que dans les cavités nasales.

- Poussières de la fraction thoracique : particules solides de 5 à 10 μm . Ces particules peuvent se déposer dans le système respiratoire et pénétrer jusqu'aux bronchioles. La plupart de ces particules vont être piégées à la surface du système muco-ciliaire qui se trouve dans la portion antérieure du système respiratoire (Chamberlain, 1967 ; Cermak & Ross, 1978).

[¶]Voir Lexique page 199

Tableau III : Tableau récapitulatif de quantification de poussières dans différents fourrages et litières destinés aux chevaux.

Auteurs	produits analysés	Concentrations
Kirschving <i>et al.</i>, 2002	litière de carton	5,6.10 ³ particules / L d'air
	copeaux de bois	3,1.10 ⁴ particules / L d'air
	paille de blé	1,1.10 ⁴ particules / L d'air
	paille de lin	9,2.10 ³ particules / L d'air
Raymond <i>et al.</i>, 1997	foin mouillé d'un mélange d'Alfalfa et de Timothy	2,8.10 ⁴ particules / L d'air
	cubes d'Alfalfa	6,4.10 ⁴ particules / L d'air
	enrubanné	6,5.10 ⁴ particules / L d'air
	foin d'un mélange d'Alfalfa et de Timothy	9,5.10 ⁵ particules / L d'air
	granulé	3,5.10 ⁴ particules / L d'air
Vandenput <i>et al.</i>, 1997	foin de mauvaise qualité	6,88.10 ⁵ particules / L d'air
	foin de bonne qualité	6,3.10 ⁴ particules / L d'air
	ensilage à 78%MS	8,7.10 ³ particules / L d'air
	ensilage à 50%MS	4,5.10 ³ particules / L d'air
	granulés d'Alfalfa	9,5.10 ³ particules / L d'air
	copeaux de bois	3,1.10 ⁴ particules / L d'air
	paille de bonne qualité	1,2.10 ⁴ particules / L d'air
	paille de lin	9,2.10 ³ particules / L d'air
Woods <i>et al.</i>, 1993	foin et litière de mauvaise qualité	2,55 mg/m ³
	copeaux de bois et des granulés	0,53 mg/m ³

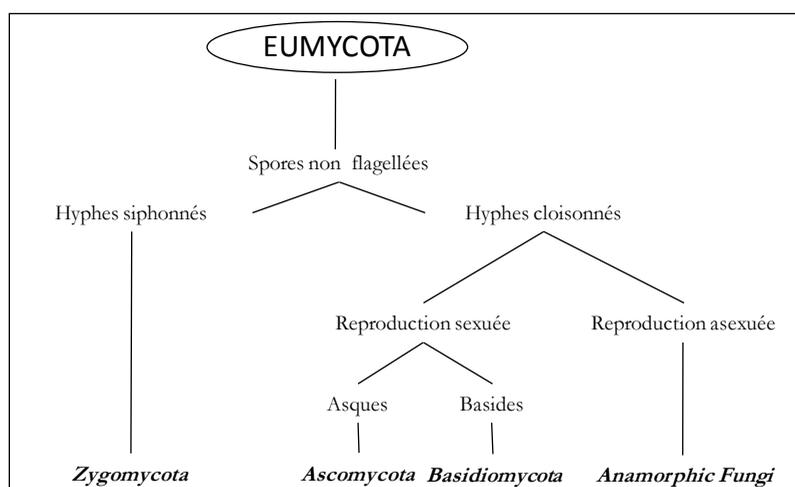


Figure 10 : Classification simplifiée des Eumycota (D'après Courtecuisse et Duhem, 2007; Kirk *et al.*, 2008).

- Poussières de la fraction respirable (ou alvéolaire) : particules solides inférieures à 5µm. Ces particules de poussières peuvent pénétrer jusqu'aux alvéoles. Une fois inhalées, ces particules absorbent l'humidité en augmentant leur taille et restent ainsi piégées dans le système respiratoire. Néanmoins, les particules inférieures à 0.5 µm demeurent en suspension et sont expulsées lorsque la personne ou l'animal expire.

Les poussières constituent un important polluant aérien dans les bâtiments d'élevage et notamment dans les écuries. Les poussières trouvent principalement leur origine dans les fourrages et les litières apportés aux chevaux. Plusieurs études ont été entreprises afin de quantifier les poussières dans l'environnement direct du cheval en utilisant différents fourrages et litières (Tableau III). Il existe une grande variabilité dans la quantité de poussières entre ces différents fourrages et litières. En général, les litières semblent être moins contaminées que les fourrages. Parmi les litières, par ordre croissant de contamination par les poussières, il y a tout d'abord la litière de carton, puis la paille de lin, la paille de blé et enfin les copeaux de bois.

Parmi différents fourrages testés, le foin est celui qui génère le plus de poussières avec 9.5 10⁵ particules /L d'air pour un foin composé d'un mélange luzerne/fléole des prés (Raymond *et al.*, 1997) et 6.88 10⁵ particules /L d'air pour un foin qualifié de mauvaise qualité (Vandenput *et al.*, 1997). A l'inverse, les fourrages conservés humides (enrubannages et ensilages) ainsi que les granulés de luzerne présentent les plus faibles concentrations en poussières. Cependant un foin qualifié de bonne qualité (Vandenput *et al.*, 1997) peut atteindre des niveaux de poussières équivalent à ceux détectés dans l'enrubannage et dans les granulés (Raymond *et al.*, 1997). Comme le montre le Tableau III le mouillage du foin réduit considérablement la concentration en poussières car de 9,5 10⁵ particules/L, le foin constitué d'un mélange de luzernes et de fléole des prés est passé à 2,8 10⁴ particules/L d'air après lavage (Raymond *et al.*, 1997). Les pratiques culturales et notamment le mode de conditionnement ont donc un impact sur la concentration en poussières.

II.2 Les moisissures et mycotoxines

II.2.1 Définition

Les moisissures sont des champignons ou *Fungi* actuellement intégrées dans le super groupe des Opisthokontes (Cavalier-Smith, 2001). Les moisissures appartiennent principalement aux *Zygomycota*, *Ascomycota* ainsi qu'aux *Anamorphic Fungi* (Figure 10). Ces derniers forment un groupe artificiel ne renfermant que des formes végétatives qui a été défini par les systématiciens afin de faciliter l'identification (Gams, 1995). Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* font partie de ce

[¶] Voir Lexique page 199

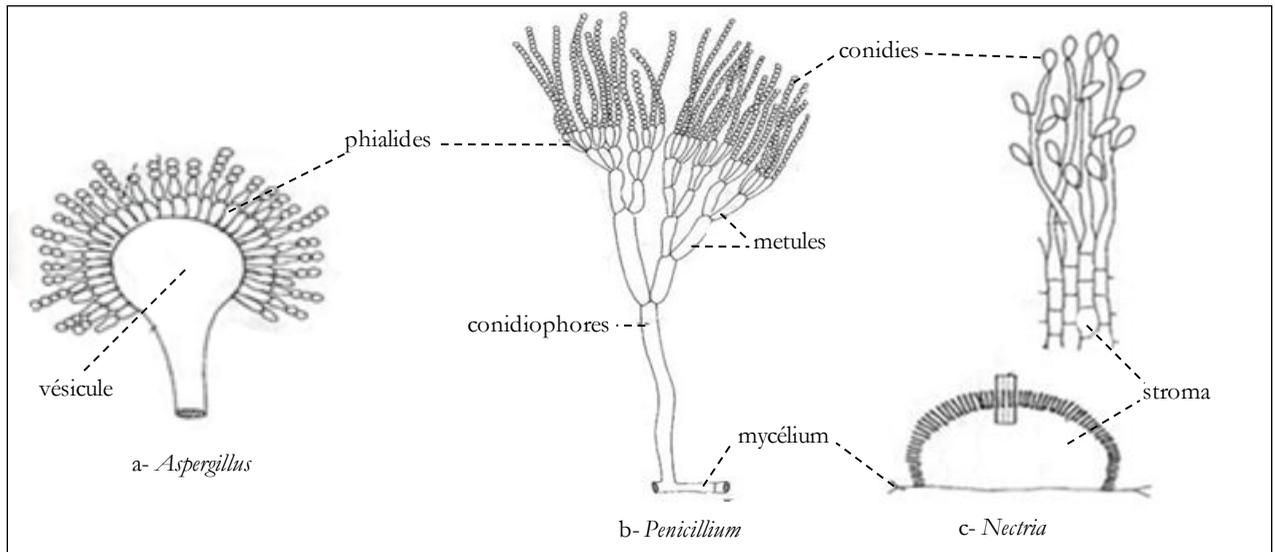


Figure 11 : Exemple de structures rencontrées chez les *Ascomycota* et les *Anamorphic Fungi* (D'après Bouchet *et al.*, 2005).

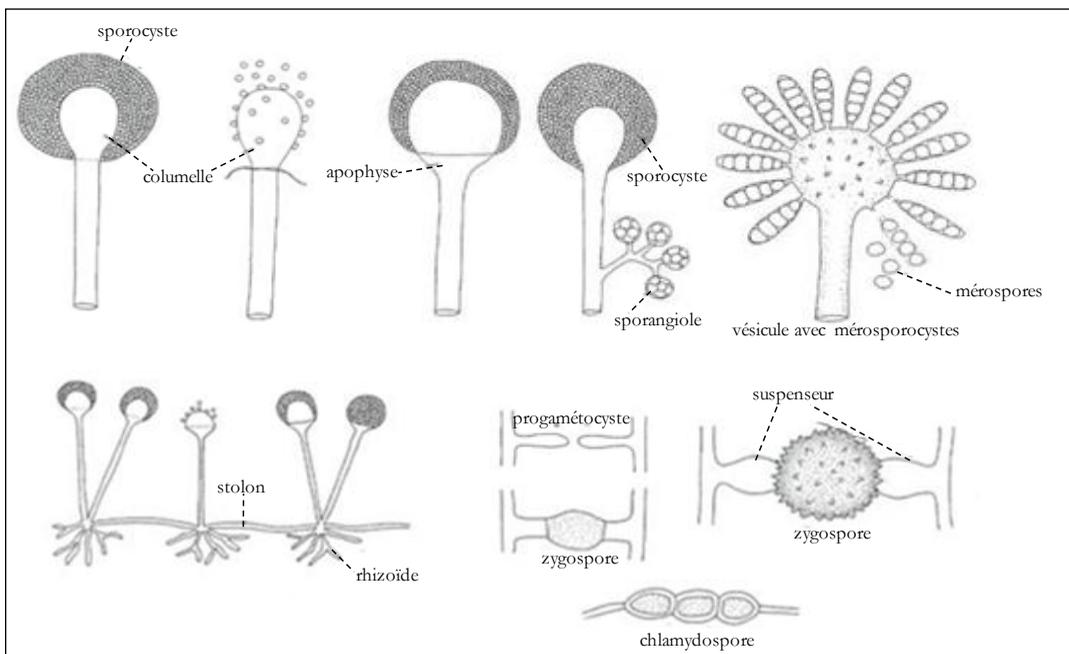


Figure 12 : Exemple de structures rencontrées chez les *Zygomycota* (D'après Samson *et al.*, 2002).

groupe. Ils constituent les formes asexuées des genres *Eurotium*, *Emericella*, *Eupenicillium* et *Talaromyces* (Bouchet *et al.*, 2005).

Les moisissures sont regroupées, avec les levures, sous le terme de micromycètes. Les moisissures sont des microorganismes eucaryotes qui constituent un ensemble hétérogène d'environ 20 000 espèces. Le terme 'moisissure' n'a pas de signification systématique ; il désigne en réalité tous les champignons microscopiques filamenteux qui ont un intérêt économique et environnemental pour l'homme, de façon bénéfique ou néfaste (Roquebert, 1997).

Les moisissures sont des micro-organismes pluricellulaires et filamenteux qui se reproduisent par des spores non flagellées. Les *Ascomycota* et les *Anamorphic fungi* présentent une structure cloisonnée isolant ainsi les noyaux. On parle d'hyphes mycéliens cloisonnés (Figure 11). Parmi eux se trouvent, les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. A l'inverse, les filaments des *Zygomycota* ne sont pas cloisonnés et contiennent ainsi de nombreux noyaux. On parle alors de structure coenocytique ou siphonnée. Les genres *Rhizopus*, *Absidia* (*Mycocladius*) et *Mucor* font partie des *Zygomycota* (Figure 12).

II.2.2 Ecologie des moisissures

Les moisissures sont toutes naturellement saprophytes. Elles se développent au détriment de matériaux inertes tels que le papier, les aliments ou des composés organiques d'origine végétale. Elles peuvent également être en symbiose ou parasite d'un hôte (Bouchet *et al.*, 2005).

Elles sont également hétérotrophes pour le carbone. Pour croître et se multiplier, elles doivent puiser dans le milieu, les nutriments nécessaires. Leurs parois étant rigides, elles renferment de la chitine ; les cellules fongiques ne peuvent phagocyter les nutriments. Les petites molécules sont directement absorbées à travers la paroi de l'appareil végétatif et les grosses molécules, après hydrolyse à l'aide d'exoenzymes, sont absorbées à leur tour. Pour cette raison, les moisissures sont également appelées « absorbotrophes » (Roquebert, 1997 ; Bouchet *et al.*, 2005). D'une manière générale, les moisissures ont besoin : d'eau, de minéraux et d'une source carbonée provenant généralement des sucres et des acides organiques (Bouchet *et al.*, 2005). Certaines espèces ont également besoin de vitamines, de stérols ou d'acides gras.

Le développement des moisissures dépend de facteurs environnementaux, comme le taux d'humidité caractérisé par l'activité en eau (aw), le pH, l'oxygène et la température (Roquebert, 1997 ; Bouchet *et al.*, 2005) :

✦ L'activité en eau correspond à la quantité d'eau libre disponible dans le substrat pour la croissance du micro-organisme. Elle est déterminée par les caractéristiques chimiques (eau

[¶] Voir Lexique page 199

retenue par les sels, les sucres, protéines) et physiques (porosité, polarité) du substrat. Les valeurs de l'activité en eau varient de 0 à 1. La valeur 0 correspond à des substrats où toute l'eau est retenue et la valeur 1 correspond à des substrats où toute l'eau est disponible comme l'eau pure. Généralement, les champignons ont un développement optimal pour des activités en eau d'environ 0,85 (Roquebert, 1997 ; Bouchet *et al.*, 2005). Les champignons sont plus tolérants à une faible activité en eau que d'autres micro-organismes comme les bactéries. Mais une activité en eau inférieure à 0,60 rend impossible la croissance fongique sans, toutefois, tuer les conidies[¶]. Chaque espèce fongique possède sa propre amplitude écologique. Par exemple, *Aspergillus ochraceus* nécessite une activité en eau comprise entre 0,95 et 0,99 et *Aspergillus flavus*, une aw comprise entre 0,84 et 0,86.

✦ Le pH : La croissance optimale d'un champignon nécessite généralement un pH compris entre 5 et 6 mais l'amplitude de pH peut s'étendre entre 3 et 8 selon l'espèce fongique. Par exemple, *Fusarium proliferatum* nécessite un pH de 5.6 pour une croissance optimale (Keller *et al.*, 1997).

✦ L'oxygène : Les moisissures ont besoin d'oxygène pour se développer. Cependant même à de très faibles teneurs en oxygène, certaines moisissures comme *Penicillium roqueforti* peuvent se développer (Moreau, 1980).

✦ La température : La plupart des moisissures sont mésophiles c'est-à-dire que leur croissance est optimale pour des températures comprises entre 20 et 25°C. Pour ces moisissures, la croissance des conidies est réduite voire arrêtée pour des températures situées en-dessous de 5°C tout en restant viables. D'autres moisissures sont dites psychotropes c'est-à-dire qu'elles sont capables de se développer lentement à des températures inférieures à 4°C comme *Penicillium verrucosum*. De façon beaucoup plus rare, certaines sont thermophiles. Leur optimum de croissance se situe alors entre 25 et 32°C mais elles peuvent aussi croître de 12 à 48°C. Il s'agit par exemple d'*Aspergillus flavus* ou d'*Aspergillus fumigatus* (Roquebert, 1997 ; Bouchet *et al.*, 2005)

Grâce à leur grande tolérance vis-à-vis de ces différents facteurs mais également grâce à leur arsenal enzymatique, les moisissures peuvent donc coloniser un grand nombre de substrats plus variés les uns que les autres (Botton *et al.*, 1990).

[¶] Voir Lexique page 199

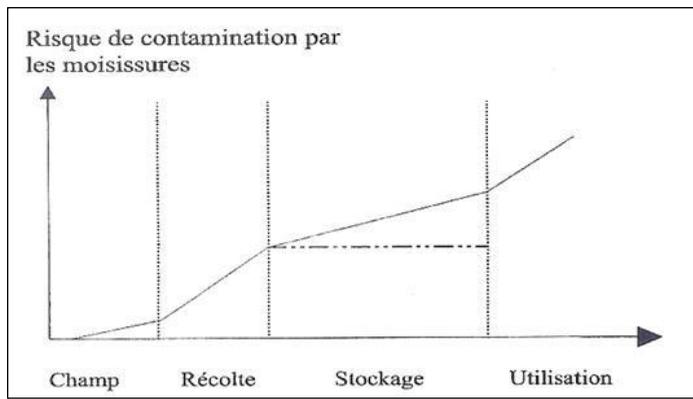


Figure 13 : Evaluation du risque de contamination par les organismes fongiques au cours de la récolte, du stockage du fourrage et de l'utilisation. (Boudra *et al.*, 2002).

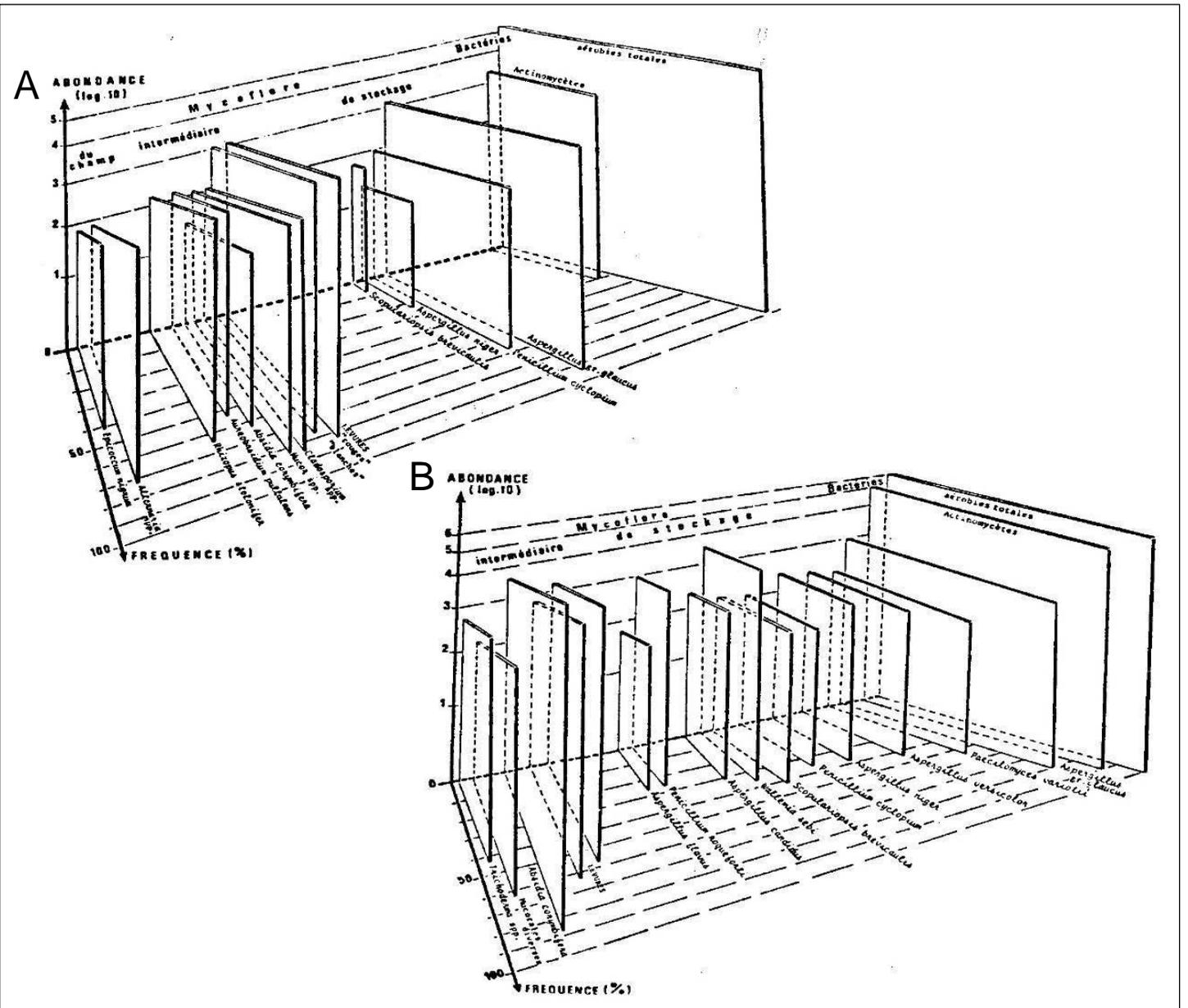


Figure 14 : Microflore caractéristique des foin récoltés dans de bonnes conditions de récolte (A) et des foin récoltés dans de mauvaises conditions de récolte (récolte à 75 % MS, pluie) (B) (Hnatyszyn & Guais, 1986).

Ces facteurs, pris individuellement ou combinés sont déterminants quant à la contamination future du foin lors du stockage. En effet, un foin récolté à plus de 25 % d'humidité va subir des fermentations au cours desquelles des moisissures ainsi que des bactéries vont se développer et la température à l'intérieur de la botte va alors augmenter, entraînant ainsi un échauffement au sein de la botte. Au-delà de 77 °C environ, des réactions chimiques exothermiques pouvant entraîner la combustion et donc des risques d'incendies peuvent intervenir (Henning & Wheaton, 1993).

La contamination débute, toutefois au champ, puis se poursuit, au cours de la récolte, du séchage, du pressage et du stockage (Figure 13). Chacune de ces étapes est caractérisée par une flore fongique spécifique. Par exemple, les genres *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* et *Epicoccum* caractérisent une flore de champ. La croissance au champ de ces espèces est favorisée par un temps froid et humide en particulier lors de la fauche et du séchage (Christensen & Kaufmann, 1965).

Après la récolte, ces espèces sont remplacées petit à petit par les espèces dites 'de stockage' caractérisées par les genres *Aspergillus*, *Penicillium* ou encore *Trichoderma*. Le développement de ces genres au cours du stockage dépend de leur température et activité en eau optimales et donc de la qualité du foin. Selon Hnatyszyn & Guais (1986), la flore fongique d'un foin bien sec sera dominée par les *Aspergillus* du groupe *glaucus*, *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus niger* et *Scopulariopsis brevicaulis* (Figure 14A) alors qu'un foin récolté humide et mal conservé sera contaminé par les *Aspergillus* du groupe *glaucus*, *Aspergillus versicolor*, *A. niger*, *A. candidus*, *Paecilomyces variotti*, *Penicillium cyclopium*, *P. roqueforti*, *Scopulariopsis brevicaulis* et *Wallemia sebi* (Figure 14B).

II.2.3 Effets sur la santé humaine et animale

Les moisissures peuvent présenter plusieurs effets sur la santé humaine et animale ; elles peuvent être toxigènes, pathogènes ou allergènes (Reboux et Millon, 2008). Les moisissures ont plusieurs voies de contamination. La plus importante ou du moins la plus étudiée est la contamination par ingestion. Toutefois, la contamination peut se faire aussi par inhalation ou par contact cutané (Kiffer & Morelet, 1997 ; Bouchet *et al.*, 2005).

II.2.3.1 Pouvoirs pathogène et allergène des moisissures

Les moisissures peuvent être à l'origine de plusieurs maladies, telles que les mycoses ou les allergies.

Les mycoses concernent généralement les muqueuses et la peau. Elles sont dues au développement de la moisissure au dépend de son hôte. Elles peuvent être bénignes ou potentiellement mortelles. La bronchomycose ou la pneumomycose chez l'homme, par exemple

[¶] Voir Lexique page 199

sont liées à des espèces du genre *Aspergillus* (Chabasse & Bouchara, 1997 ; Kiffer & Morelet, 1997 ; Bouchet *et al.*, 2005). Chez le cheval, il existe également des aspergilloses comme celle touchant les poches gutturales[¶]. Les principales espèces incriminées dans ces mycoses sont *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* et *Emmericella nidulans* (Cook *et al.*, 1968 ; Guillot *et al.*, 1996 et 1997).

Les allergies liées aux champignons sont dues à l'inhalation de spores de moisissures dans l'air ambiant mais aussi à l'ingestion d'aliments contaminés par des champignons. Ces allergies se traduisent, chez l'homme, par des rhinites, de la conjonctivite, des bronchites, de l'asthme ou des vomissements. L'inhalation de constituants de la paroi comme les glucanes des spores fongiques et d'éléments mycéliens entraîne une réaction inflammatoire et immunologique médiée par les immunoglobulines IgE[¶] (Rosenberg, 2005).

La voie par ingestion est certes la plus étudiée, mais la voie par inhalation peut également engendrer un certain nombre de pathologies notamment respiratoires chez l'animal et plus particulièrement le cheval mais aussi chez l'homme dans le milieu professionnel notamment agricole (Rosenberg, 2006 ; Thaon *et al.*, 2007). Parmi elles, la plus fréquemment rencontrée est la maladie du poumon du fermier. Elle touche principalement les agriculteurs durant la période hivernale lorsque les animaux sont à l'étable et qu'ils sont nourris au foin. C'est une pneumopathie inflammatoire aiguë ou chronique, due à l'inhalation chronique ou répétée d'une grande variété d'antigènes organiques ou chimiques de faibles poids moléculaire (Dalphin, 2001). Plusieurs moisissures, présentes dans les poussières des fourrages, semblent impliquées dans l'étiologie de cette maladie, *Eurotium amstelodami* (Reboux *et al.*, 2001), *Penicillium brevicompactum* (Yoshida *et al.*, 1996 ; Nakagawa-Yoshida *et al.*, 1997), *Absidia (Mycocladus) corymbifera* (Reboux *et al.*, 2001 ; Roussel *et al.*, 2004 & 2005) ou encore *Wallemia sebi* (Lappalainen *et al.*, 1998).

II.2.3.2 Pouvoir toxigène des moisissures

Certaines moisissures produisent des métabolites secondaires, appelées mycotoxines qui peuvent aboutir à une intoxication appelée mycotoxicose. Les mycotoxines sont de faible masse moléculaire et sont produites par des champignons filamenteux. Selon Cole & Cox (1981), il existerait environ 300 mycotoxines. Les mycotoxines sont des contaminants naturels de l'environnement. Comme pour les moisissures en général, la voie de contamination majoritaire est l'ingestion de nourriture mais elle peut également survenir par inhalation ou par contact cutané.

Une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques mais pas obligatoirement par tous les isolats d'une même espèce. De même, dans certains cas une même espèce fongique peut produire plusieurs mycotoxines. C'est le cas, par exemple d'*Aspergillus*

[¶]Voir Lexique page 199



Figure 15 : « The Beggars » par Pieter Bruegel the Elder en 1568, (ca. 1525-1569). Cette peinture représente des victimes de l'ergotisme gangréneux engendré par *Claviceps purpurea* au Moyen-Âge, appelé également « Feu de Saint Antoine ». L'ergotisme est la plus ancienne mycotoxicose reconnue chez l'homme. Copyright Réunion des Musées Nationaux/ Art Resource, NY, Louvre, Paris, France.

fumigatus qui peut produire de la gliotoxine, de la fumigaclavine, de la fumagilline et de la fumitremorgène (Quillien, 2000).

La présence d'un champignon ne signifie pas nécessairement la synthèse de mycotoxine. Celle-ci dépend, en effet, de facteurs environnementaux (oxygène, humidité, température, type de substrat) et nutritionnels mais aussi de facteurs de stress (Castegnaro & Pfohl-Leszkowicz, 2002).

Les mycotoxines peuvent provoquer des effets sur la santé humaine ou animale:

- *Toxicité aiguë.* Dans ce cas, il s'agit d'une seule exposition à de très fortes doses de mycotoxines. Le cas de toxicité aiguë le plus connu est l'ergotisme. Cette pathologie connue également sous les noms de 'feu sacré', 'feu de Saint-Antoine' ou 'mal des ardents' s'est manifesté, au Moyen-âge, suite à l'ingestion de pain contaminé par la toxine de *Claviceps purpurea*. Cette pathologie provoquait chez les personnes atteintes des formes de délires, des douleurs violentes et des gangrènes (Richard *et al.*, 2003 ; Reboux, 2006). (Figure 15)

- *Toxicité chronique.* Elle intervient après une exposition répétée et à long terme à de faibles doses de mycotoxines. Les effets les plus connus sont des effets hépatotoxiques (aflatoxines), neurotoxiques (gliotoxine), mutagènes, immunotoxiques (ochratoxine A, trichothécènes), oestrogéniques (zéaralénone) ou encore cancérogènes (Aflatoxine B₁).

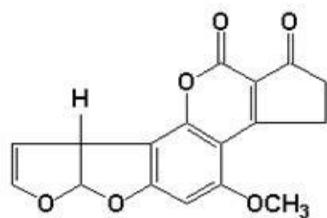
Peu de données sont disponibles concernant la contamination par les mycotoxines des foin et encore moins concernant l'effet des mycotoxines sur les chevaux. Les données dans la littérature sur les fourrages conservés concernent essentiellement les ensilages d'herbes (O'Brien *et al.*, 2005) ou de maïs (Richard *et al.*, 2007 & 2009). Parmi les mycotoxines identifiées dans les fourrages conservés, se trouvent la gliotoxine, la Roquefortine C et la toxine PR (Gareis & Wernery, 1994 ; Auerbach *et al.*, 1998 ; O'Brien *et al.*, 2007).

D'autres mycotoxines peuvent être responsables de pathologies équinées qui seront discutées plus tard, telles que les aflatoxines, les fumonisines, des fusariotoxines comme le déoxynivalénol, la zearalénone et des trichothécènes produits par le genre *Stachybotrys* (Schurg & Noon, 1979 ; Gimeno & Quintanilla, 1983 ; Wilson *et al.* 1990 ; Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Meerdink, 2002 ; Raymond *et al.*, 2003)(Figure 16).

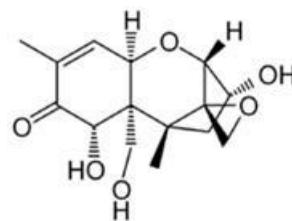
a. Les aflatoxines

Les aflatoxines sont produites majoritairement par des *Aspergillus* du groupe *flavus* (principalement *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus*). Ce sont des composés hétérocycliques insaturés et des dérivés difuranocoumariniques (Bennett & Klich, 2003). Leur masse moléculaire

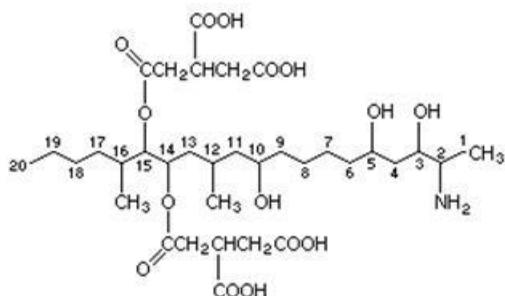
[¶]Voir Lexique page 199



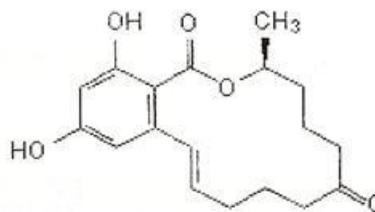
Aflatoxine (B₁)



Déoxynivalénol



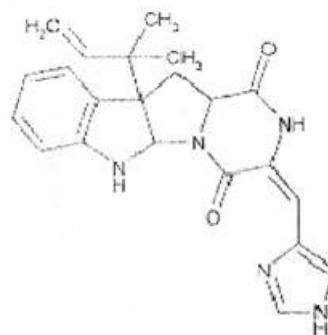
Fumonisine (B₁)



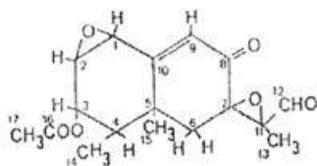
Zéaralénone



Gliotoxine



Roquefortine C



Toxine PR

Figure 16 : Structures des mycotoxines détectées dans les fourrages conservés (Gareis & Wernery, 1994 ; Auerbach *et al.*, 1998 ; Buckley *et al.*, 2007 ; O'Brien *et al.*, 2007) et/ou ayant un effet sur la santé équine (Schurg & Noon, 1979 ; Gimeno *et al.*, 1983 ; Wilson *et al.*, 1990 ; Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Meerdink, 2002 ; Raymond *et al.*, 2003) à savoir les aflatoxines, la gliotoxine, la zéaralénone, le déoxynivalénol, les fumonisines, la toxine PR et la roquefortine.

varie de 312 à 330g/mol. Elles sont très peu solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants non polaires. D'autres espèces beaucoup plus rares peuvent également en produire : *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus pseudotamari* et *Aspergillus ochraceoroseus* (Bennett & Klich, 2003).

Les aflatoxines majoritaires sont nommées B1, B2, G1, G2. Elles ont la particularité d'émettre une fluorescence caractéristique sous l'action des rayons U.V. Ainsi les aflatoxines B (pour Blue) ont une inflorescence bleue et les aflatoxines G (pour Green), une inflorescence verte. L'aflatoxine B est considérée comme la plus dangereuse de part sa toxicité et sa fréquence dans les denrées alimentaires (Bennett & Klich, 2003).

Elles ont été découvertes suite à des investigations menées pour la « maladie X du dindon » qui a entraîné la mort de plus de 100 000 dindons en Angleterre dans les années 1960. Cette maladie provoquait des nécroses hépatiques et une hyperplasie biliaire. Elle était engendrée par la présence des aflatoxines dans la nourriture de ces dindons à base de tourteaux d'arachides. La production de ces toxines nécessite une température optimale comprise entre 25 et 37 °C (Ashworth *et al.*, 1969 ; Maggon *et al.*, 1977 ; Logrieco *et al.*, 2003) et une activité en eau (a_w) comprise entre 0.82 et 0.98. La production d'aflatoxines intervient principalement au champ et au cours du stockage.

Les effets des aflatoxines sur la santé animale varient selon les doses, le temps d'exposition, l'espèce, l'âge et le statut nutritionnel. Les principaux effets des aflatoxines sont immunologiques, hépatotoxiques et carcinogéniques. Chez le cheval qui est très sensible à l'action des mycotoxines, des cas d'aflatoxicose ont été identifiés. Des dommages hépatiques ont été mis en évidence suite à une exposition de 500 à 100 ppb d'aflatoxines (Schurg & Noon, 1979 ; Meerdink, 2002). D'autres signes cliniques des aflatoxicoses chez le cheval ont été observés, tels que des signes d'ataxie, d'hyperthermie, d'anorexie, d'ictère et d'hémorragie. L'issue des symptômes est généralement mortelle lorsque les doses d'aflatoxines dépassent 0.1mg/kg d'aliment.

b. La gliotoxine

La gliotoxine est produite par plusieurs moisissures telles qu'*Aspergillus fumigatus*. Elle est hautement immunosuppressive, génotoxique, cytotoxique et apoptotique (Waring *et al.*, 1988 ; Nieminen *et al.*, 2002 ; Upperman *et al.*, 2003). Elle appartient au groupe de métabolites fongiques appelé épipolythiodioxopipérazine.

Des intoxications conduisant à la mort de plusieurs chameaux ont été expliquées par la présence de gliotoxine dans du foin contaminé par *Aspergillus fumigatus* (Gareis & Wernery, 1994).

[¶]Voir Lexique page 199

c. Les fusariotoxines : les trichothécènes et la zéaralénone

➤ Les trichothécènes

Les trichothécènes appartiennent à une famille d'environ 150 composés appartenant au groupe des sesquiterpénoïdes et sont produits majoritairement par le genre *Fusarium*, notamment par *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*, mais aussi par les genres *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys* et *Trichoderma* (Cole & Cox, 1981 ; Ueno, 1983 ; Scott, 1989).

Les trichothécènes sont répartis en 4 groupes (Bennett & Klich, 2003):

- Groupe A : il renferme les trichothécènes qui ne présentent pas de fonction cétone en C8. Il s'agit par exemple de la toxine T-2, la toxine HT-2 et le diacétoxyscirpénol (DAS)
- Groupe B : ces trichothécènes présentent une fonction cétone en C8. Les plus importants sont le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV).
- Groupe C : ce sont les trichothécènes qui ont un époxyde supplémentaire en C7 comme la crotocine.
- Groupe D : ce sont des trichothécènes macrocyclique entre le C4 et C15. Dans ce groupe se trouvent par exemple les verrucarines.

Plusieurs de ces trichothécènes sont des contaminants naturels des denrées alimentaires tels le deoxynivalénol (DON), la toxine T-2, le nivalénol. Le DON est le plus couramment rencontré dans l'orge, le blé, le riz mais aussi dans des aliments mixés (Miller *et al.*, 2001). Après une ingestion à fortes doses par des animaux d'élevage comme le porc, le DON peut entraîner des nausées, des vomissements, et des diarrhées. A faibles doses, les animaux présentent une perte de poids et un refus de s'alimenter (Rotter *et al.*, 1996). Pour ces raisons, le DON est parfois appelé 'vomitoxine'.

Chez le cheval, Raymond *et al.* (2003) ont mis en évidence qu'une consommation de grains contenant 14 ppm de DON entraînait une diminution de la consommation alimentaire. De même en 2005, Raymond *et al.* ont confirmé ces résultats et ont également mis en évidence une perte de poids des chevaux nourris avec des grains contaminés.

D'autres trichothécènes produits notamment par les espèces *Stachybotrys chartarum*, *Stachybotrys alternans* et *Stachybotrys atra* existent. Ces espèces qui sont des saprophytes dégradant la cellulose colonisent naturellement le foin, la paille et le sol (Forgacs, 1965 ; Hintikka, 1976, Guerre, 2000). Leurs mycotoxines, à savoir, la satratoxine, la verrucarine et roridine (Sorenson *et al.*, 1987) sont plus toxiques que la toxine T-2 et peuvent entraîner des affections appelées les stachybotryotoxicoses à haut niveau de mortalité (Bennet & Klich, 2003). Ces affections ont été décrites pour la première fois en Europe Centrale en 1931 chez les chevaux et le premier cas aigu de stachybotryotoxicoses toujours chez les chevaux a été révélé en Europe de l'est en 1977 (Le

[¶] Voir Lexique page 199

Bars, 1977). Ces pathologies sont principalement rencontrées chez le cheval (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Mais il existe quelques rares cas de stachybotryotoxicoses chez l'homme, notamment dans le domaine agricole car ils peuvent être en contact avec du foin moisi (Hintikka, 1978). La consommation de foin contaminé par ces mycotoxines peut donc entraîner des signes neurologiques comme des tremblements, une détérioration ou perte de la vision, des dermonécroses ou encore des hémorragies (Richard *et al.*, 2003).

➤ La zéaralénone

La zéaralénone est produite principalement par *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* et *Fusarium equiseti*. La zéaralénone est identifiée comme une lactone de l'acide résorcyclique. Elle est naturellement présente dans le maïs ayant une forte humidité mais elle est beaucoup plus rare dans le foin comme le suggère Osweiller (1996) en faisant référence aux foins américains. Il existe, en effet, peu d'études révélant la présence de zéaralénone dans le foin. Coulombe (1993) souligne la présence de ZEA dans du foin moisi et des granulés et Buckley *et al.* (2007), quant à eux, ont mis en évidence que 9 % des foins irlandais et 5 % des foins canadiens analysés dans leur étude étaient contaminés par cette mycotoxine. La production de zéaralénone est favorisée par une forte humidité et une faible température (Coulombe, 1993). Son principal effet est oestrogénique et l'animal le plus sensible est le porc (Hagler *et al.*, 2001). Chez le cheval, une seule étude a mis en évidence le développement de mycotoxicoses après ingestion de maïs contaminé à hauteur de 2.6 ppm de zéaralénone (Gimeno & Quintanilla, 1983).

Les effets oestrogéniques de la zéaralénone résultent de la liaison de cette mycotoxine ou de ses métabolites à des récepteurs cytoplasmiques des oestrogènes ER α et β (Kuiper *et al.*, 1998). Dans une étude réalisée sur le rat, la zéaralénone ainsi que ses deux dérivés sont en compétition avec le 17 β -oestradiol pour le récepteur cytosolique (Klang *et al.*, 1978). La zéaralénone apparaît avoir une meilleure affinité pour les récepteurs à oestrogènes que 17 β -oestradiol chez l'animal. Pour cette raison, la zéaralénone peut être classée parmi les œstrogènes non stéroïdiens ou les mycoœstrogènes.

La zéaralénone présente également des effets immunotoxiques, hépatotoxiques et hématotoxiques (Zinedine *et al.* 2007).

d. *Les fumonisines*

Les fumonisines, découvertes en 1988, sont produites par *Fusarium verticillioides* (anciennement nommée *Fusarium moniliforme*) et *Fusarium proliferatum*. Il existe plusieurs fumonisines : A₁, A₂, B₁ à B₄, C₁ à C₄ et P₁ à P₄ ; la B₁ étant la plus courante. Les fumonisines sont

[¶] Voir Lexique page 199

des contaminants naturels qui sont produits exclusivement au champ, sur du maïs et du sorgho. La contamination par les fumonisines est favorisée par de fortes températures estivales ainsi que par les lésions engendrées par des insectes sur les tiges et les épis de maïs (Nelson *et al.*, 1993).

L'action des fumonisines résulte de l'inhibition de la synthèse de sphingolipides. En effet la fumonisine B₁ (FB₁) est un analogue structural de la sphinganine et de la sphingosine qui sont des intermédiaires de la biosynthèse et de la dégradation des sphingolipides (D'Mello *et al.*, 1997). Ainsi la FB₁ bloque la biosynthèse des sphingolipides en inhibant la sphingosine (sphinganine) N-acyltransférase. Cette modification du métabolisme des sphingolipides engendre de nombreux effets sur la santé animale et humaine.

Les fumonisines sont, tout d'abord, à l'origine de la leucoencéphalomalacie chez le cheval (ELEM). Des cas d'ELEM ont été confirmés en Hongrie, au Brésil, en Afrique du Sud et aux USA (Marasas, 1995). La consommation de maïs contaminés par des fumonisines induit cette ELEM. La ELEM est un désordre neurologique aigu et fatal pour le cheval (Marasas *et al.*, 1988). Les signes cliniques sont une hypersensibilité, des dérangements locomoteurs, une ataxie et une parésie. Un œdème du cerveau et des poumons peuvent également survenir. Une étude menée par Wilson *et al.* (1990) a montré que 14 chevaux sur 18 présentaient l'ELEM après avoir consommé des aliments à base de maïs contaminé par des doses de FB₁ comprises entre 37 et 122 ppm.

e. La toxine PR et la roquefortine C

La roquefortine C et la toxine PR sont deux mycotoxines produites par *Penicillium roqueforti* qui présentent des effets trémorgènes. Des concentrations de l'ordre de 6.8 mg/kg de roquefortine ont pu être détectées dans des fromages de type bleu (Scott & Kennedy, 1976). La toxine PR, quant à elle, est instable dans le fromage et réagit alors avec l'ammoniaque et les acides aminés libres ce qui la transforme en PR imine qui est peu toxique (Moreau, 1980). Dans d'autres conditions, la toxine PR peut inhiber la synthèse des protéines et de l'ARN (Moulé *et al.* 1976, 1978). La roquefortine C pouvant être également produite par *Penicillium commune*, *Penicillium palitans* et *Penicillium crustosum*, présente des propriétés neurotoxiques (Wagener *et al.* 1980). La Roquefortine C est l'une des mycotoxines produites par *P. roqueforti* la plus retrouvée dans les ensilages d'herbe (Auerbach *et al.*, 1998) alors que la toxine PR n'est qu'occasionnellement, détectée dans les ensilages d'herbes (Skaar, 1996). Il y a très peu de données disponibles concernant leurs effets sur la santé animale.

[¶] Voir Lexique page 199

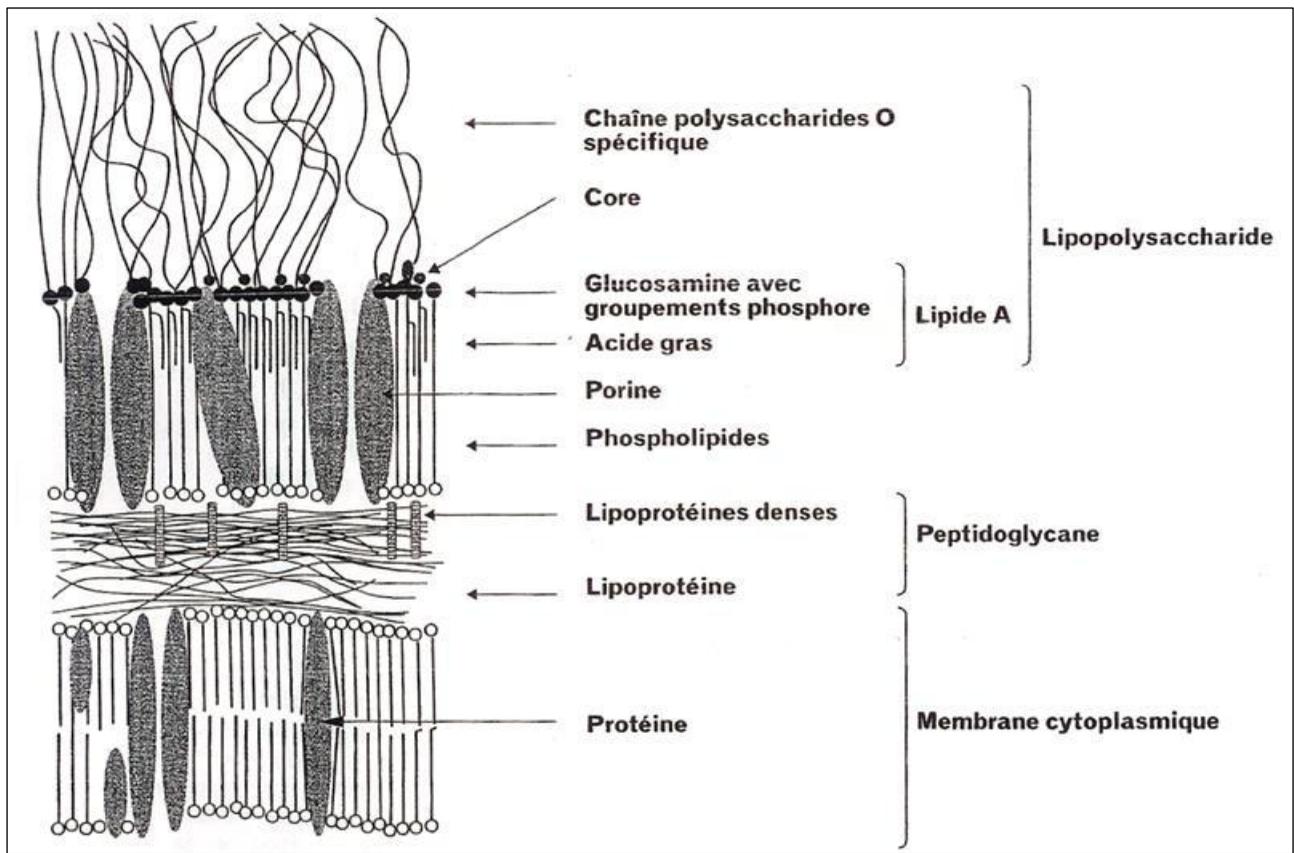


Figure 17 : Structure de la paroi d'une bactérie Gram- (Greff-Mirguet, 2002).

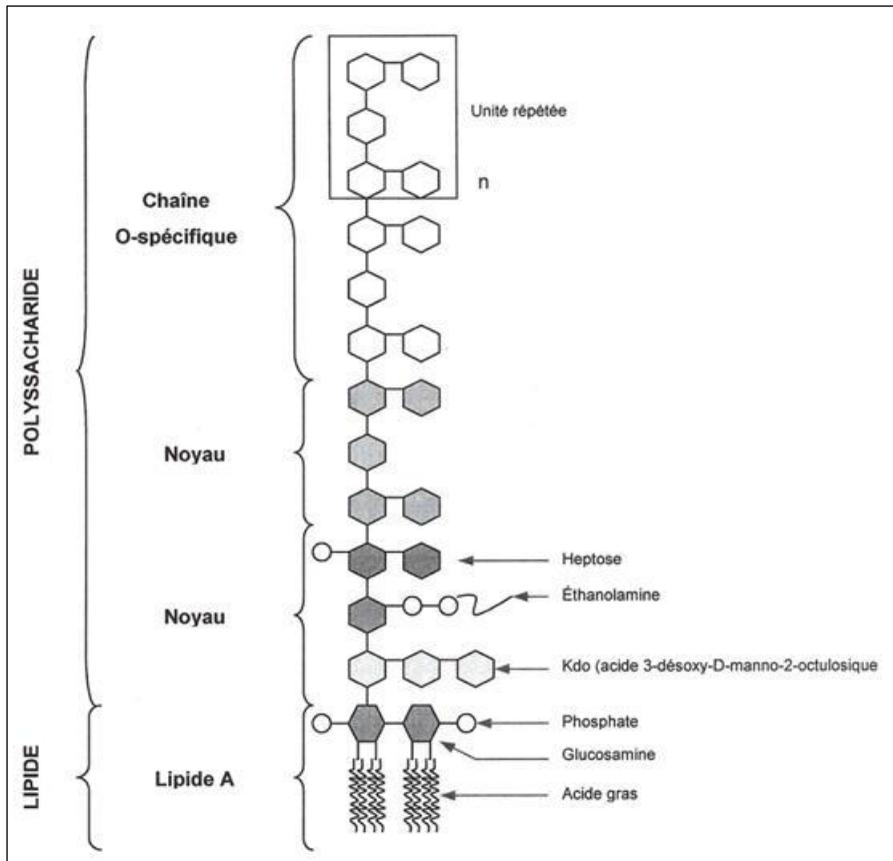


Figure 18 : Structure du LPS chez *Salmonella typhimurium* (INRS, 2005).

II.3 Les endotoxines

Les endotoxines sont des constituants chimiques complexes de la paroi externe des bactéries Gram négatif, de certaines cyanobactéries et de certaines algues vertes (Lei et Morisson, 1988). Elles présentent une masse moléculaire élevée variant de 2000 à 20 000 daltons. Malgré la demi-vie assez courte des bactéries productrices d'endotoxines dans les poussières aériennes, l'activité des endotoxines persiste même après leur mort. Une accumulation d'endotoxines est donc possible dans les poussières, sur une surface et un environnement aérien stable.

Les termes 'endotoxine' et 'lipopolysaccharide' (LPS) sont souvent employés pour désigner la même chose. Cependant le terme LPS désigne les substances chimiques pures et libres de tout autre composé chimique, présentes dans la paroi des bactéries Gram- alors que le terme 'endotoxine' désigne les fragments de paroi des bactéries Gram- qui contiennent les LPS et les autres composés de la membrane cellulaire (Figure 17). Les LPS constituent une famille de composés (Ulmer, 1997) dont la composition varie d'une espèce à une autre mais également au sein d'une même espèce (Caroff & Karibian, 2003). Les LPS expliquent la majorité des propriétés biologiquement actives, caractéristiques des endotoxines (Morrisson & Ryan, 1979 ; Rietschel *et al.*, 1994). Ils sont constitués d'une partie polysaccharidique et d'une partie phospholipidique, le lipide A (Figure 18). Le polysaccharide est responsable de l'activité antigénique du LPS et le lipide A est le siège de l'activité toxique et pro-inflammatoire.

Les endotoxines sont reconnues comme étant des facteurs importants dans l'étiologie de plusieurs maladies pulmonaires humaines telles que l'asthme (Douwes & Heederik, 1997) ou le syndrome des poussières organiques toxiques. Des endotoxines ont notamment été identifiées dans le domaine industriel, en particulier l'industrie du coton (Kennedy *et al.*, 1987), du textile, de l'alimentation animale (Smid *et al.*, 1992) mais aussi dans le milieu agricole (Krysinska-Traczyk *et al.*, 2004 ; Spaan *et al.*, 2006). Après une exposition à de hauts niveaux d'endotoxines, les personnes sensibles peuvent présenter une toux sèche, une insuffisance respiratoire accompagnée d'une diminution de la fonction pulmonaire, de fièvre, de tremblements ainsi que de malaises.

Les endotoxines semblent également être impliquées dans des infections respiratoires chez le cheval (Pirie *et al.*, 2002).

II.4 Les grains de pollen

Les grains de pollens constituant une part des poussières, désignent 'l'ensemble des spores ou des spores germées mâles (= prothalles) des Gymnospermes et Angiospermes (Reille, 1990).

[¶] Voir Lexique page 199

Tyrophagus putrescentiae



Acarus siro

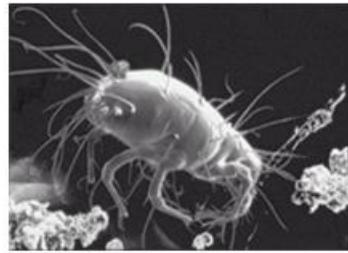


Figure 19 : Photographies de deux espèces d'acariens, *Tyrophagus putrescentiae* et *Acarus siro* pouvant être retrouvées dans le foin (source: futura-science, 2006).

Les grains de pollens sont produits par les étamines des plantes à fleurs. Ils peuvent être de tailles très différentes. Ils sont formés dans l'anthère à partir de cellules mères à noyau diploïde volumineux.

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant le lien les pollens présents dans le foin et le cheval. Les seules données disponibles concernent l'homme et la contamination de l'air ambiant par les pollens. Les pollens sont impliqués dans un certain nombre d'allergies, les pollinoses. Les réactions pathologiques issues de pollinose sont : (i) le rhume des foins ou coryza spasmodique qui provoque entre autres, des éternuements, une congestion des muqueuses nasales et de la conjonctivite ; (ii) l'asthme bronchique qui se traduit par des difficultés à respirer, une toux qui peut entraîner des vomissements ; (iii) la trachéite spasmodique qui est une variété d'asthme dont les lésions sont observées au niveau du larynx, de la trachée et des grosses bronches (Renault-Miskovsky & Petzold, 1989).

Ces réactions allergiques peuvent être provoquées lorsque les pollens sont émis en grande quantité, lorsqu'ils sont de petite taille pouvant ainsi parcourir de grandes distances dans l'atmosphère par pollinisation anémophile, et pénétrer dans les voies respiratoires profondes ou lorsqu'ils présentent un fort pouvoir allergisant. Les pollens allergisants sont ceux qui comportent des substances de nature protéique ou glycoprotéique reconnues comme immunologiquement néfastes pour un individu donné. Parmi les pollens, ceux des *Poaceae*, des Platanes, des *Urticaceae*, des Frênes, des Plantains mais aussi de l'Ambroisie ou encore du Bouleau sont les plus allergisants (Renault-Miskovsky & Petzold, 1989).

II.5 Les acariens

Les acariens font partie de l'ordre des *Acarina* dans la classe des *Arachnida*. Cet ordre comporte trois familles qui sont incriminées dans plusieurs maladies respiratoires. Il s'agit de la famille des *Pyroglyphidae*, des *Acaridae* et des *Glyciphagidae*. Ils sont ubiquistes. Seules les deux dernières familles comportent des acariens dits de stockage dont *Lepidoglyphus destructor* et *Glycophagus domesticus* de la famille des *Glyciphagidae* et *Tyrophagus putrescentiae* et *Acarus siro* de la famille des *Acaridae* qui peuvent être retrouvés dans les foins (Figure 19).

Les acariens peuvent se reproduire rapidement et très facilement lorsque toutes les conditions sont réunies soit une hygrométrie de 65 à 80% et une température comprise entre 20 et 30°C. Ils se nourrissent de débris de peau ou de cheveux mais aussi de moisissures.

[¶] Voir Lexique page 199

Les débris d'acariens morts et leurs déjections sont responsables de certaines allergies (Emberlin, 2000). La voie de contamination principale par les acariens est l'inhalation mais elle peut également se faire par contact et par exemple amplifier une dermatite d'une personne sensible. Certains antigènes, protéines ou glycoprotéines produits par les acariens, sont reconnus comme étrangers par l'organisme, et entraînent une réponse immunitaire puis une pathologie comme l'asthme ou la rhinite. Les réactions allergiques connaissent des périodes d'accalmies et de crises. Ces réactions interviennent principalement lorsque la personne sensible est dans un milieu confiné et très contaminé par les acariens. D'après Volland-Francqueville & Sabbah (2004), les chevaux pourraient présenter des réponses allergiques aux acariens.

III. La Production de foin

Après un petit rappel sur l'histoire de la production de foin, nous aborderons les différentes étapes de production puis les effets des pratiques culturales sur la qualité du foin.

La production de foin est connue sous le nom de « *fenaison* ». Ce terme regroupe la fauche, le fanage et le stockage de l'herbe pour l'alimentation des animaux. L'essentiel de cette production est, en général, autoconsommé au sein de l'exploitation qui le produit. Seule une très petite partie est commercialisée.

III.1 Historique

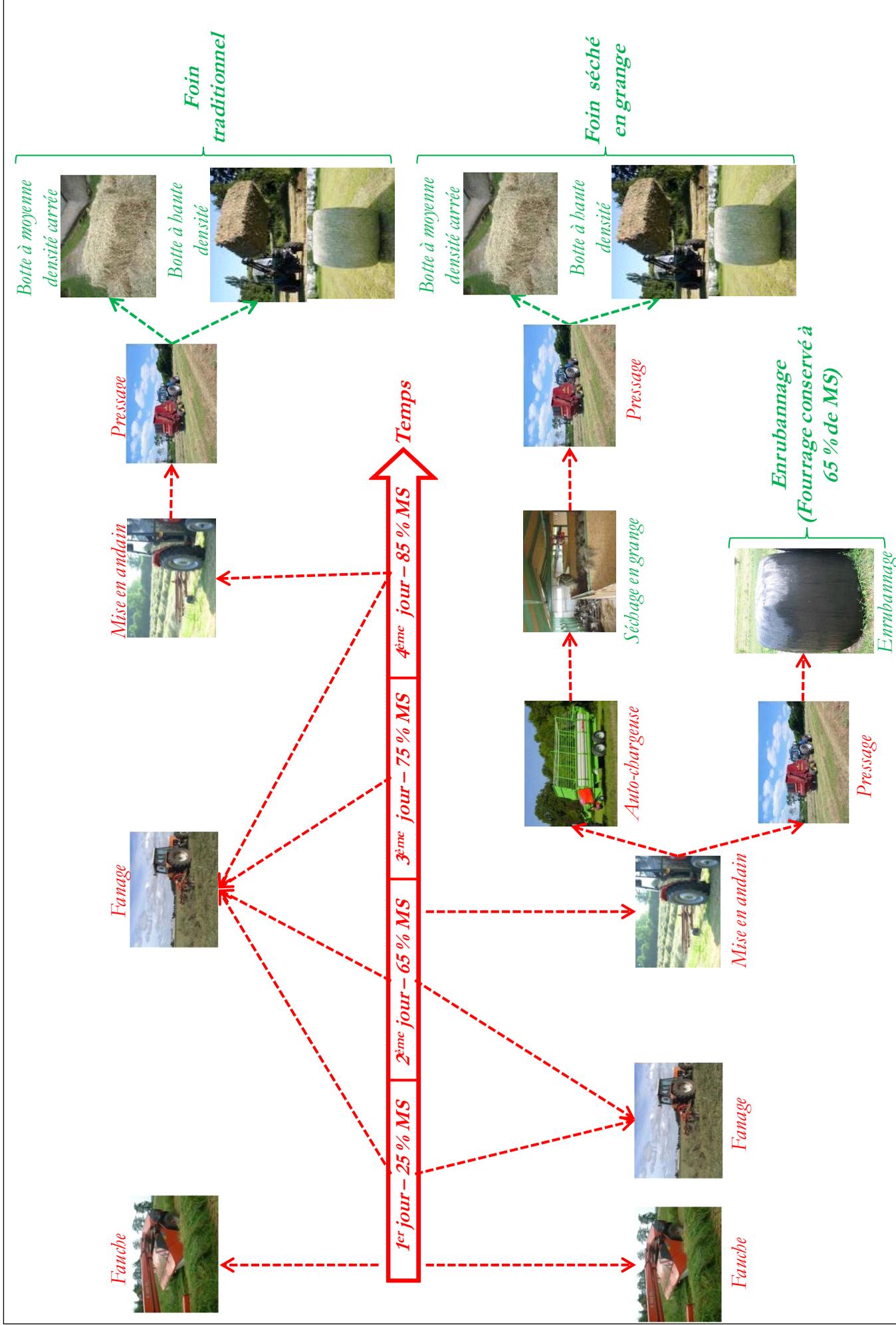
Jusqu'au début du XX^{ème} siècle, la fenaison était l'une des activités les plus importantes de l'année car le rendement et la qualité du foin récolté conditionnaient la santé et les performances du troupeau pendant la mauvaise saison. La fenaison avait lieu de fin mai à début juillet selon les régions et les altitudes. Toute la famille ainsi que des saisonniers participaient à la tâche afin d'accélérer la récolte et d'éviter que les orages estivaux ne mouillent le foin. Tous les rôles étaient prédéfinis : les hommes fauchaient, les femmes et les enfants fanaient et ratissaient l'herbe pour former les andains[¶]. L'herbe était ensuite retournée et étalée au râteau ou à la fourche pour sécher durant 1 à 2 journées. A cette époque, après avoir séché, le foin était récolté soit en vrac à l'aide d'une fourche sur des charrettes, puis engrangé dans les greniers de la ferme ou soit dressé en meules dans les prés. La technique la plus couramment employée était l'utilisation d'une structure en trépied de façon à éviter les prises au vent et à permettre l'écoulement de l'eau de pluie sans pénétrer à l'intérieur de la meule. Les petites meules servaient uniquement à faire sécher le foin en l'éloignant de l'humidité du sol et les grandes meules étaient édifiées lorsque les greniers étaient pleins (Noël & Brisebarre, 2006).

A partir de la fin des années 1800, la faucille qui régnait en maître dans la panoplie de l'agriculteur a été progressivement remplacée par des machines de plus en plus performantes : faux rotative (1806 par Gladstone), faucheuse à lame cisailante et à traction animale (1830 par Mc Cormick), faucheuse cisailante et à sections remplaçables (1847 par Hussey), faucheuse rotative (1956), faucheuse-conditionneuse-andaineuse (1962), ...

On peut, *a priori*, penser que cette mécanisation importante, réduisant largement le labeur humain requis, a engendré un certain nombre de modifications notamment de la qualité sanitaire

[¶] Voir Lexique page 199

Figure 20 : Schéma récapitulatif de la production de foin sous des conditions météorologiques favorables.



du fourrage : la densité de celui-ci est plus importante, sa composition potentiellement plus hétérogène notamment en terme d'humidité résiduelle, et enfin les risques de contamination en particulier par le sol peuvent être accentués par la mécanisation du fanage.

III.2 Pratiques culturales

Dans nos régions, la récolte des foins se déroule de fin mai à début juillet pour les premières coupes et jusqu'en septembre pour les regains. La production de foin comporte 7 étapes : la fauche, le conditionnement, le fanage, l'andainage, le pressage, le transport et le stockage (Figure 20).

III.2.1 La fauche

La coupe des parties aériennes, ou fauche, des espèces prairiales est réalisée à l'aide d'une faucheuse par cisaillement, par impact ou par lacération. La faucheuse par cisaillement est principalement utilisée pour des fourrages à faible densité comme la luzerne, en raison des risques de bourrage. La faucheuse par impact permet d'avoir une vitesse d'avancement élevée quelle que soit la densité de l'herbe ou encore le taux d'humidité. Et la fauche par lacération permet un effet de conditionnement par lacération des tiges facilitant ainsi le séchage.

Une fauche à une hauteur de 5 cm, est généralement effectuée. Elle résulte d'un compromis : trop basse, elle risque d'accroître la contamination par le sol (irrégularité, taupinière) et trop haute, elle affecterait négativement le rendement. Cette fauche est en générale réalisée en fin de journée lorsque les conditions sont sèches, les plantes sont alors moins riches en eau et plus riches en sucre.

III.2.2 Le conditionnement juste après la fauche

Le conditionnement est un traitement mécanique destiné à accélérer les processus de séchage. Il permet d'améliorer le potentiel d'évaporation de la plante à l'aide d'une action mécanique sur le foin fauché. En dégradant la cuticule qui est une couche extra-épidermique de cutine (acide gras) permettant la protection de l'épiderme, l'action de 'conditionnement' augmente la porosité des tissus végétaux et en particulier des tiges qui sont les organes végétaux les plus difficiles à sécher. Différents types de conditionneurs sont proposés : les conditionneurs à doigts, les conditionneurs à rouleaux et les conditionneurs à fléaux. Les conditionneurs sont montés à l'arrière de la faucheuse. Malgré l'effet bénéfique d'un conditionnement 6h après la

[¶]Voir Lexique page 199

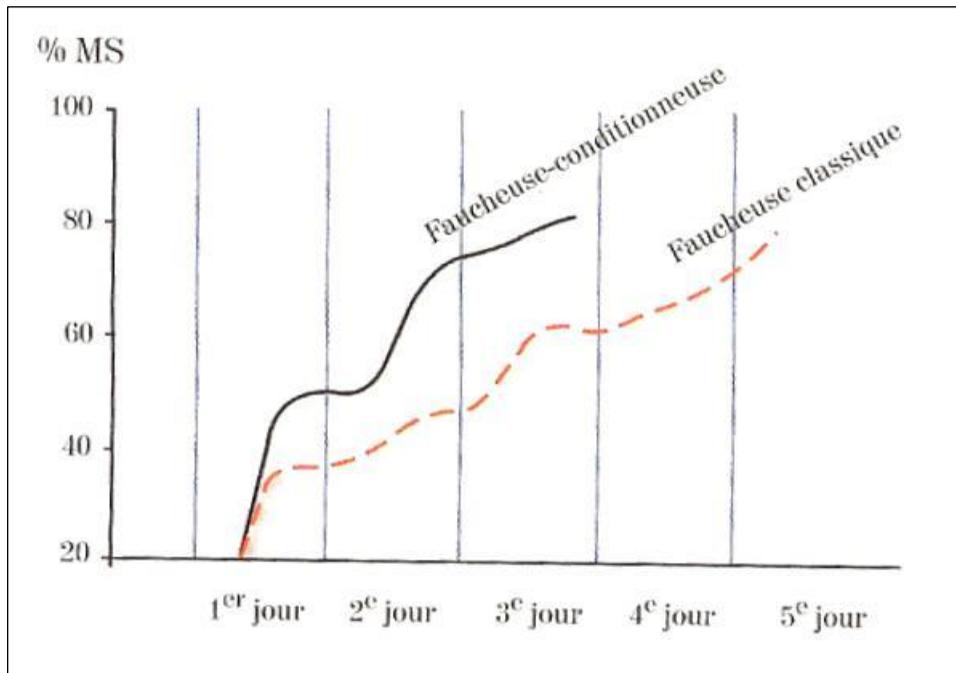


Figure 21 : Comparaison de la vitesse de séchage en fonction du type de faucheuse utilisée : faucheuse classique versus faucheuse conditionneuse. (D'après Arvalis, 2003).

fauche, démontré par Descoteaux et Savoie (2002), le conditionnement est réalisé, en général, directement après la fauche pour des raisons pratiques.

Suite à cette pratique, le foin est mis en andain c'est-à-dire aligné. La faucheuse-conditionneuse procure deux avantages comparé à une faucheuse classique. Elle permet à la fois de réduire la surface de contact du foin avec le sol et d'offrir une plus grande surface de mise au vent favorisant dès lors un séchage plus rapide (Figure 21).

III.2.3 Le Fanage

Le fanage est une opération mécanique qui consiste à retourner et remuer l'herbe fraîchement fauchée pour la faire sécher uniformément et arriver à un taux d'humidité à la récolte d'environ 20 à 25 % MS. Cette opération permet de remonter à la surface les brins proches du sol et ainsi homogénéiser la dessiccation du fourrage. Cependant, des effets néfastes sur les plantes tels que des cassures sur les organes les plus fragiles comme les feuilles, peuvent être observés suite à un nombre trop important de fanages. Ils doivent être réduits au minimum.

III.2.4 L'andainage

L'andainage est une technique employée juste après la fauche et le conditionnement mais également juste avant le pressage afin de faciliter la reprise du fourrage par une remorque autochargeuse ou par une presse pour le conditionnement en balle ronde par exemple.

III.2.5 Le pressage

Le conditionnement final du foin est réalisé à l'aide d'une presse pour former soit des balles carrées à moyenne densité (15 à 30 kg), des balles rondes (180 à 380 kg) ou des bottes à haute densité (400 à 1000 kg)(Vignau-Lousteau et Huyghe, 2008).

L'utilisation des balles carrées à moyenne densité régresse de plus en plus au profit du conditionnement en balles rondes car il présente plusieurs inconvénients : il offre une grande surface aux intempéries, nécessite un stockage rapide sous un hangar et demande une main d'œuvre importante. Elles sont plutôt utilisées par les petites exploitations laitières, les petits haras ou par des particuliers ayant quelques animaux d'élevage.

Le mode de pressage sous forme de balles rondes est le plus utilisé car elles présentent une plus faible surface aux intempéries et peuvent rester au champ plusieurs jours après le pressage facilitant ainsi l'organisation du travail. Lors du pressage pour ce type de conditionnement, la dessiccation doit être excellente (environ 80 %) car leur forte densité (130 à 180 kg/m³) pourrait favoriser une forte contamination par des moisissures. Toutes les étapes

[¶]Voir Lexique page 199

Tableau IV : Principaux constituants chimiques des fourrages (D'après Drogoul *et al.*, 2004).

		Eau		H ₂ O	
Matière brute	Matière sèche	Matière minérale		Macroéléments	Chlore, phosphore, soufre, calcium, sodium, magnésium, potassium
				Oligoéléments	Fer, cuivre, zinc, cobalt, manganèse, iode, sélénium, etc.
		Matière organique	Glucides	Glucides cytoplasmiques	Pentoses, hexoses (glucose, fructose ect.), saccharose, maltose, lactose, mélibiose, fructosanes, amidon, etc.
				Glucides pariétaux des végétaux	Cellulose, hémicellulose, substances pectiques (lignine)
			Lipides	Lipides	Glycérides, stérides, cérides
			Composés azotés	Composés azotés protidiques	Acides aminés libres, combinaison d'acides aminés (peptides, polypeptides, protéines)
		Composés azotés non protidiques		Amides (urée, etc.), amines, ammoniacque, bases azotées	

concernant ce type de conditionnement, c'est-à-dire du pressage à l'utilisation dans la ration animale, sont mécanisées. Ce mode de pressage est utilisée dans des exploitations laitières de taille moyenne à grande ainsi que dans les haras.

Enfin, il existe un troisième mode de conditionnement sous forme de bottes à haute densité. Cette forme de conditionnement, approuvée dans les années 90, a permis de réduire les volumes de stockage. Cependant l'investissement dans ce genre d'appareil reste important, ce qui limite son développement. Il est principalement utilisé par l'intermédiaire d'une CUMA (Coopérative d'Utilisation de Matériel Agricole) pour des exploitations laitières de grande taille.

III.2.6 Le stockage

Le foin est un mode de conservation par voie sèche de l'herbe, qui nécessite des conditions de stockage optimales afin de limiter les risques de pertes de valeur alimentaire mais également sanitaire.

Il doit donc être stocké suffisamment sec (> 80 % MS), par exemple, dans des hangars, afin de le protéger des intempéries et ainsi éviter les risques d'échauffement qui peuvent entraîner des pertes de valeur alimentaire et sanitaire (Henning & Wheaton, 1993 ; Demarquilly *et al.*, 1998).

Même si le coût de production du foin est faible, le coût des infrastructures nécessaires au stockage du foin peut être élevé comparé au foin enrubonné qui peut rester dehors.

III.3 La qualité nutritive des fourrages

Auparavant, les préoccupations majeures des chercheurs mais aussi des éleveurs portaient essentiellement sur la qualité nutritive des foins afin d'améliorer la production de lait et de viande des bovins et des ovins essentiellement. Ainsi la majorité des études réalisées sur le foin concernaient la qualité nutritive des foins ainsi que les effets de cette dernière sur la production et la qualité nutritive et organoleptique des produits animaux (Coulon *et al.*, 1997 ; Buchin *et al.*, 1998 ; Verdier-Metz *et al.*, 2000 ; Priolo *et al.*, 2001 ; Coulon et Priolo, 2002).

III.3.1 Les principaux éléments constitutifs du foin

Les nutriments apportés par le foin sont l'eau, les matières organiques comme les glucides, les composés azotés, les lipides, les vitamines ainsi que des matières minérales (Tableau IV). La valeur nutritive, les qualités organoleptiques et l'ingestibilité des aliments résident donc dans les caractéristiques chimiques et physiques de ces composés.

✦ L'eau

[¶] Voir Lexique page 199

Tableau V : Principaux constituants glucidiques des fourrages (D'après Drogoul *et al.*, 2004).

Localisation	Dénomination		Unités constitutives
Contenu cellulaire	Sucres libres	Glucose Fructose Saccharose Mélibiose	Glucose, fructose Glucose, galactose
		Polyosides de réserves	Fructanes Amidon
Parois	Polyosides	Cellulose	Glucose
		Hémicelluloses	Xylose, arabinose, galactose, mannose, glucose, acide glucuronique
		Substances pectiques	Acide galacturonique, arabinose, galactose
	Substances non glucidiques	Lignine	Alcool coumarylique, alcool coniférylique, alcool synapylique
		Cires (cutine)	Alcools et acides gras à longue chaîne

Dans les différents aliments proposés aux herbivores (ensilage, betterave, foin, tourteaux), la teneur en eau est très variable. Au pâturage, une vache laitière qui consomme 70 kg d'herbe consomme en même temps 60 L d'eau (Jean-Blain, 2002) alors qu'une quantité équivalente de foin, n'apportent qu'environ 9 L d'eau.

✦ Les constituants glucidiques

Il existe deux grands types de constituants glucidiques selon leur localisation et leur fonction, dans la cellule végétale. L'amidon, les fructanes et le saccharose sont situés dans le cytoplasme et la vacuole et sont des composés de réserve alors que la cellulose et la lignine, par exemple sont des constituants de la paroi et permettent le soutien du végétal (Tableau V).

Le dosage de ces constituants pariétaux permet de prévoir la digestibilité de la matière organique avec plus ou moins de précision selon la méthode de dosage employée. La méthode de Weende, couramment utilisée, permet de doser la cellulose brute qui est constituée par la majeure partie de cellulose, de quantités variables de lignine, d'une petite partie d'hémicellulose et de quelques composés azotés. Pour un végétal donné, les relations entre les variations des teneurs en cellulose brute et en paroi et lignine sont constantes. Par conséquent, le dosage de la cellulose brute est bon indicateur de la digestibilité de la matière organique mais également de la valeur énergétique.

✦ Les composés azotés

Les constituants azotés sont majoritairement présents dans le cytoplasme et les membranes des cellules et se répartissent en deux groupes selon leur nature chimique et leur taille: les protéines et peptides et les composés azotés simples (amines, amides, nitrate, nitrite, ammonium).

✦ Les constituants lipidiques

Les constituants lipidiques sont des biomolécules organiques insolubles dans l'eau. Chez les végétaux, ils sont localisés essentiellement dans les membranes des cellules et des organites dans la cuticule des feuilles. Les lipides sont généralement représentés par des triglycérides autrement dit des esters d'acides gras et le glycérol. Les lipides, également appelés matière grasse, sont caractérisés par les différents acides gras qui les composent.

[¶] Voir Lexique page 199

✦ Les vitamines

Les vitamines sont des substances organiques plus ou moins stables. Elles sont présentes en très faible quantité dans certains aliments. Les vitamines doivent être apportées dans la ration car elles ne peuvent être synthétisées par l'organisme. Cependant l'organisme peut produire certaines vitamines telles que la vitamine K, appelée également vitamine de coagulation, la vitamine C et des vitamines du groupe B qui sont des cofacteurs enzymatiques ayant un rôle indispensables au fonctionnement cellulaire. Les vitamines ont un rôle de catalyseurs dans de nombreuses réactions métaboliques. Elles doivent donc être apportées en quantité suffisante afin de permettre de bonnes performances zootechniques. Les vitamines sont classées selon leurs solubilités en 2 groupes (Drogoul *et al.*, 2004) : les vitamines liposolubles (A, D, E et K) et les vitamines hydrosolubles (B et C).

✦ Les minéraux

Les minéraux se trouvent sous forme de sels libres ou associés à des composés organiques, par exemple, le phosphore dans les acides nucléiques. Les minéraux sont répartis en 2 groupes selon leur abondance dans les aliments : les minéraux majeurs (ou macroéléments) tels que le Calcium, le Phosphore, le Magnésium, le Sodium, le Chlore et le Soufre, et les minéraux mineurs (ou oligoéléments) tels que le Fer, le Cuivre, le Cobalt, le Manganèse, le Molybdène et le Zinc et 3 métalloïdes : le Sélénium, le Fluor et l'Iode (Drogoul *et al.*, 2004). La teneur de ces minéraux dans les fourrages dépend de la nature du sol, de l'espèce ou du stade de croissance de la plante et du climat. Les minéraux jouent plusieurs rôles bien connus : un rôle structural (os, dents), un rôle de régulateur (homéostasie, perméabilité) et un rôle d'activateur (métalloenzymes)

III.3.2 Effets des pratiques culturales sur la qualité nutritive et l'appétence du foin

Tout au long de la production de foin, c'est-à-dire du choix de la parcelle jusqu'au moment du stockage, différents facteurs vont déterminer la qualité nutritive. Ces facteurs sont soit externes comme les conditions météorologiques, soit intrinsèques aux tissus végétaux récoltés et aux processus de récoltes tels que les caractéristiques du couvert végétal à faner (flore, quantité de fourrages à sécher) et la mécanisation (conditionnement lors de la fauche, fanage, ...). Les pratiques culturales ainsi que les conditions climatiques affectant directement la qualité nutritive des foins, ces deux facteurs seront abordés ensemble (Dulphy, 1987 ; Demarquilly *et al.*, 1998).

[¶] Voir Lexique page 199

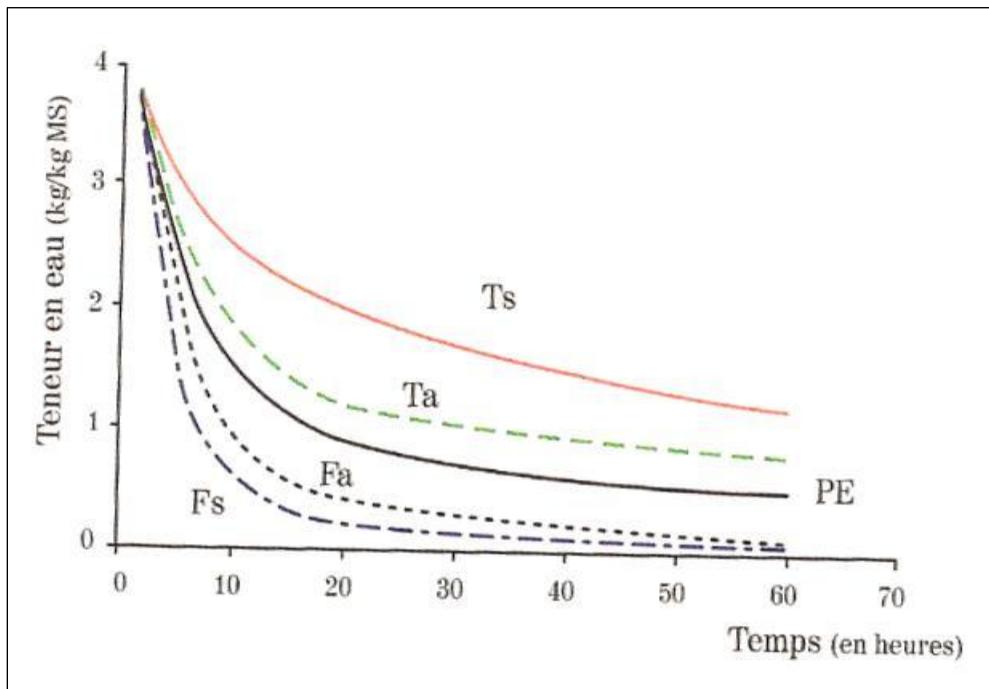


Figure 22 : Courbe de dessiccation d'une plante entière (P.E.) de ray-grass italien au stade début épiaison du premier cycle accompagnée des courbes de dessiccation des tiges et des limbes pris individuellement ou associés. Les courbes de dessiccation Ts et Ta concernent respectivement les aptitudes de séchage des tiges séparées (Ts) ou non (Ta) des limbes. Les courbes de dessiccation Fs et Fa concernent respectivement les aptitudes de séchage des limbes séparées (Fs) ou non (Fa) des tiges (20°C-50°C HR -1m/s) (D'après Jones, 1979).

Certains de ces facteurs peuvent également avoir des effets sur la qualité sanitaire du foin. Des hypothèses concernant l'effet des pratiques culturales sur la qualité sanitaire des foins seront alors également émises.

III.3.2.1 La composition floristique

Le choix de la composition floristique de la parcelle est l'un des éléments déterminants pour la production mais aussi pour la qualité nutritive et l'appétence des foins. Les *Fabaceae* sont plus riches en protéines et en calcium que les *Poaceae* (Giovanni, 1988). Parmi les différentes *Poaceae* prairiales, des différences existent également en termes d'appétence ou de productivité fourragère. Le Ray-grass anglais (*Lolium perenne*) et la Fétuque des prés (*Festuca pratensis*) présentent une appétence élevée contrairement à la fétuque élevée (*Festuca arundinacea*) qui se caractérise quant-à-elle par une faible appétence mais une bonne productivité fourragère (Huyghe *et al.*, 2005). Au sein des *Fabaceae*, des différences sont également observées. Le trèfle blanc (*Trifolium repens*) présente une bonne appétence, une bonne digestibilité ainsi qu'une teneur élevée en protéine. La luzerne (*Médicago sativa*) présente, quant à elle, une bonne productivité à l'inverse du lotier corniculé (*Lotus corniculatus*), par exemple, qui a une productivité limitée (Huyghe *et al.*, 2005).

D'après ces connaissances concernant la qualité nutritive, un rôle de la composition floristique sur la qualité sanitaire peut également être suggéré. Par exemple, d'après les agriculteurs, certaines espèces de *Poaceae* sont plus poussiéreuses que d'autres telles que la Houlque (*Holcus lanatus*).

L'aptitude de séchage des espèces prairiales peut être variable au sein d'une même espèce en fonction de sa morphologie mais aussi entre des espèces différentes :

- *Effet de la morphologie*

Jones, en 1979, a étudié les aptitudes à la dessiccation des différents organes comparés à celles de la plante entière (Figure 22). Les tiges, de part leur structure, au sein d'une plante, sont difficiles à sécher. Elles contiennent beaucoup d'éléments pariétaux lignifiés qui entraînent une faible perméabilité aux échanges avec l'extérieur. Elles offrent, par ailleurs, une surface de séchage très restreinte avec un nombre relativement réduit de stomates. Le conditionnement permet en cassant les tiges d'augmenter la surface de contact avec l'air et ainsi d'accélérer le processus de séchage (Savoie *et al.*, 1994). A l'inverse, les feuilles présentent un potentiel de dessiccation élevé de part leur structure principalement constituée de parenchyme cellulaire et leur grande surface de contact avec l'extérieur dont la face inférieure est recouverte de stomates qui permettent ainsi

[¶] Voir Lexique page 199

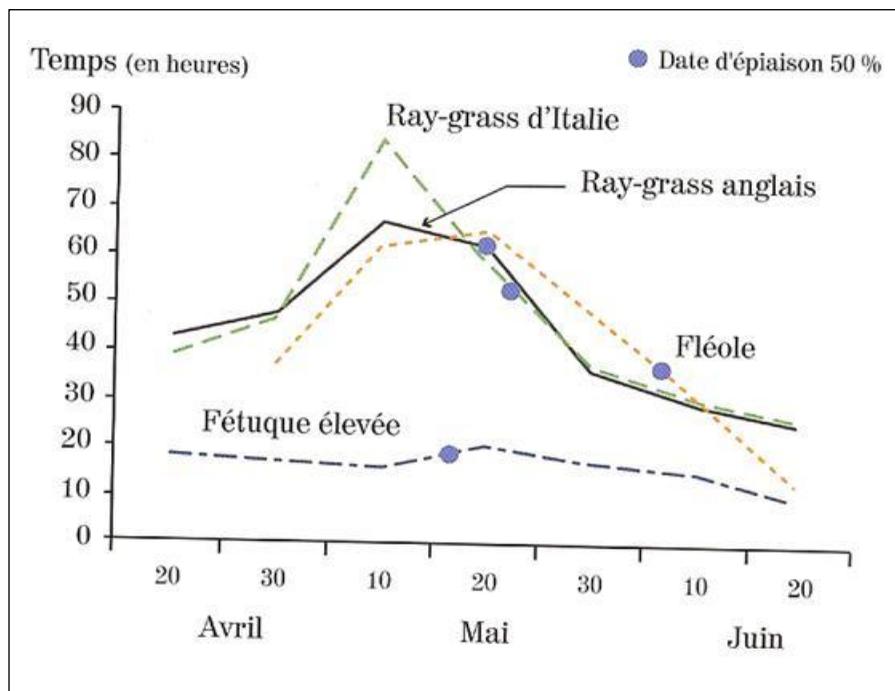


Figure 23 : Influence de l'espèce végétale et du stade de végétation sur la durée de séchage (flux d'air de 1m/s, 20°C-50° % d'humidité relative) nécessaire pour atteindre 67% de MS (D'après Jones & Prickett, 1981).

une bonne capacité d'évaporation. Ainsi, dans de bonnes conditions climatiques, des fourrages présentant un maximum de feuilles sècheront plus rapidement, réduisant ainsi la durée de séchage au champ alors que des fourrages avec des tiges comme des foin de *Poaceae* en fin de stade épiaison nécessiteront un temps de séchage plus important.

- *Entre les espèces*

Les différentes espèces prairiales présentent des capacités de dessiccation contrastées pour plusieurs raisons. Par exemple, le Ray-grass d'Italie (*Lolium multiflorum*) qui présente une faible densité de stomates ou encore le Trèfle violet (*Trifolium pratense*) qui présente une teneur en eau élevée auront une plus mauvaise aptitude de séchage. En règle générale, les *Fabaceae* ont une vitesse de séchage plus élevée que les *Poaceae*.

Jones & Prickett (1981) ont étudié chez 4 *Poaceae* prairiales (Ray-grass d'Italie, Ray-gras anglais, Fléole, Fétuque élevée) l'effet du stade de végétation sur la durée de séchage (Figure 23). Il s'avère que le ray-grass d'Italie présente la plus faible capacité de dessiccation et ceci pour la raison citée précédemment. A l'inverse, la fétuque élevée présente la plus grande capacité de dessiccation qui est relativement homogène durant tous les stades de vie de la plante.

La variation du temps de séchage peut donc être expliquée par la variation de l'épaisseur de la cuticule et par le rapport feuille/tige qui change d'une espèce à l'autre

Ces éléments peuvent également suggérer un effet sur la qualité sanitaire des fourrages notamment sur la poussière et les organismes fongiques. On pourrait donc émettre l'hypothèse à priori, qu'une espèce végétale, selon son potentiel de dessiccation plus ou moins rapide, entraînera une prolifération fongique variable.

III.3.2.2 Les pratiques culturales et les conditions climatiques

Au sein de chacune des étapes de production, le foin peut subir des dégradations pouvant affecter sa qualité nutritive et potentiellement sa qualité sanitaire. Le choix du stade de récolte et la mécanisation au niveau des étapes de production sont les facteurs principaux pouvant entraîner des dégradations et des pertes de matière végétale. Les conditions climatiques peuvent influencer les pertes en fonction de leur effet sur :

- *Le stade de maturité de l'herbe à la fauche*

Le stade de récolte est un élément fondamental car la valeur alimentaire du fourrage à la récolte va définir la qualité finale du foin. Ainsi la période propice à la récolte se situe en début d'épiaison pour les *Poaceae* et en début de floraison pour les *Fabaceae* car au-delà la valeur alimentaire du fourrage diminue rapidement. Cependant les récoltes de foin peuvent être réalisées

[¶] Voir Lexique page 199

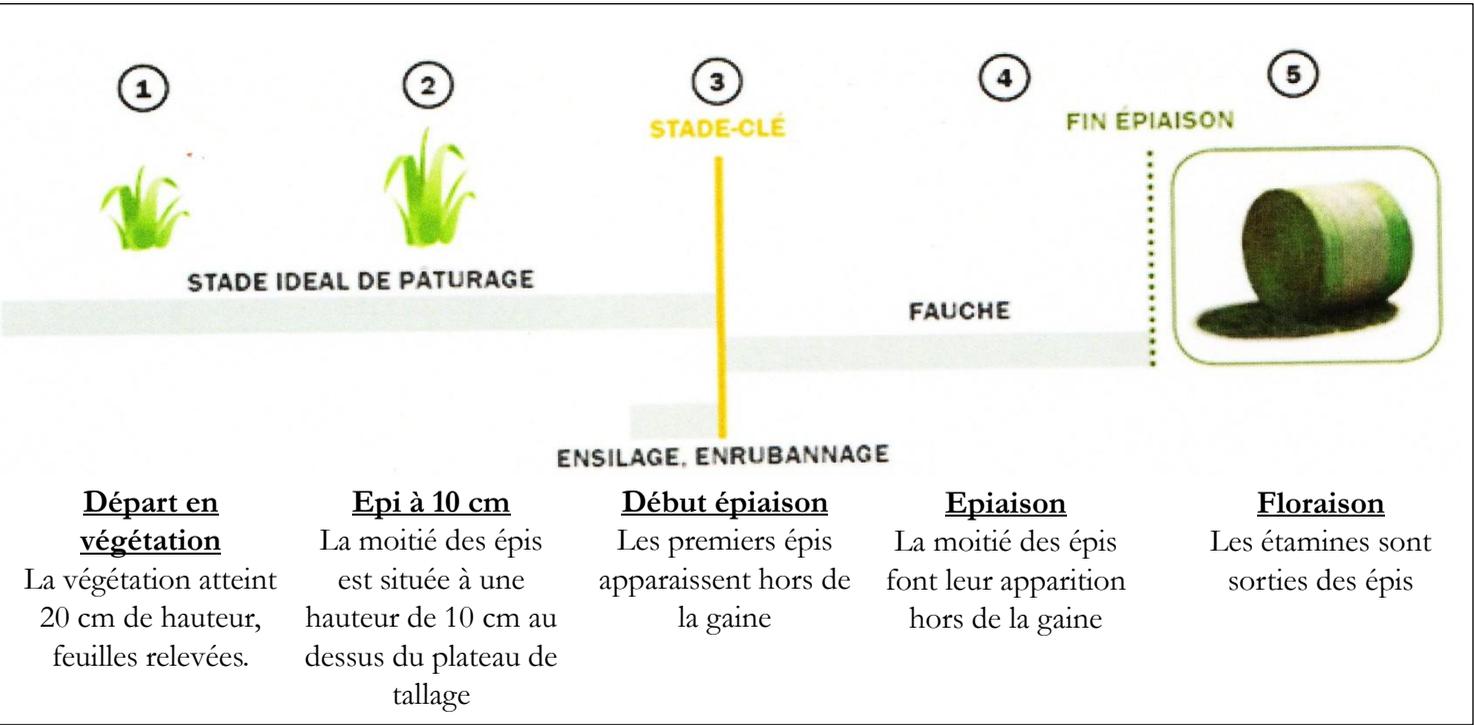


Figure 24 : Stades de développement des espèces prairiales et stades de récolte conseillé pour l'ensilage, l'enrubannage et le foin (Herbe-actifs.org, 2009).

jusqu'à la fin de l'épiaison (Figure 24). De plus une *Poaceae* fauchée en feuille sans fleurs ni graines ne présente pas les oligo-éléments et les vitamines nécessaires à une ration de santé car tous les éléments sont mobilisés au cours de la croissance pour finalement être stockés dans les graines et les racines. Par conséquent, fauché trop tôt, l'herbe contient un excès d'eau et trop tard, la plante se dessèche et les tiges deviennent cassantes (Bertrand & de Halleux, 2005).

- *La mécanisation*

La mécanisation de chacune des étapes dans la production fourragère entraîne des pertes de matière végétale. Les pertes correspondent principalement à la dégradation des tissus végétaux. Parmi ces tissus, les plus sensibles sont les feuilles, les tiges étant beaucoup plus riches en constituants pariétaux. La majorité de ces pertes sont des composés glucidiques ou protéiques qui vont directement jouer un rôle sur la valeur alimentaire des foins. Les pertes augmentent avec la rapidité de la dessiccation liée à la température de séchage et la teneur en eau (Honig, 1979). Ces pertes peuvent survenir :

➤ A la fauche-conditionnement

Des pertes de feuilles notamment de *Fabaceae* sont observées suite au passage du conditionneur. Par exemple, les conditionneurs à fléaux peuvent entraîner une perte d'environ 17% de MS alors que les autres à doigts ou à rouleaux n'occasionnent que 10% de pertes de MS. Ces conditionneurs semblent être les plus adaptés aux *Fabaceae* (Vignau-Loustau & Huyghe, 2008).

➤ Lors du séchage au sol,

Les pertes sont déterminées par les conditions météorologiques de séchage.

Lorsque les conditions climatiques sont favorables (soleil, vent), les pertes par la respiration cellulaire sont faibles (3 à 4% MS) et le nombre de fanage est réduit. Plus les hygrométries seront basses, plus les pertes seront faibles. Ainsi les pertes de la digestibilité et d'énergie nette ainsi que les modifications de la valeur azotée seront plus faibles (Dulphy, 1987).

A l'inverse, des conditions climatiques défavorables, en particulier des pluies, entraînent une augmentation du temps de séjour au champ (4 à 7 jours). Durant cette période, les pertes liées à la respiration cellulaire ainsi que celle liées aux retournements successifs par la faneuse augmenteront, respectivement de 8 à 10 % et de 0.5 à 2.5 %. Une pluie peut également accentuer ce phénomène de 2 à 4% selon le pourcentage de matière sèche au moment de l'intempérie. Dans ces conditions, il y aura une diminution des glucides solubles et des feuilles accompagnées d'une augmentation relative des constituants pariétaux et d'une réduction de la digestibilité du foin

[¶]Voir Lexique page 199

Tableau VI : Modifications de composition chimique, de digestibilité et d'ingestibilité entre fourrages verts et fourrages conservés (d'après Demarquilly *et al.*, 1998).

	Modification des teneurs		Modifications de la :	
	Matières azotées	Cellulose brute	Digestibilité de la MO (point)	Matière sèche ingérée*
Foins de graminées				
Ventilés en grange	-8	+21	-3,9	-7
Séchés au sol, beau temps	-8	+21	-3,9	-13
Séchés au sol < 10jours, pluie	-16	+43	-5,9	-14
Séchés au sol > 10jours, pluie	-14	+55	-9,3	-17
Foins de luzerne				
Ventilés en grange	-18	+33	-4,1	-11
Séchés au sol, beau temps	-22	+56	-5,2	-15
Séchés au sol, pluie	-27	+99	-10,1	-20

*: en g/kg P Les diminutions de quantité ingérée chez le mouton intègrent en partie les variations de leur capacité d'ingestion avec la saison

(Tableau VI). Des pertes dans le contenu azoté seront également observées de l'ordre de 10 à 20g/kg de MS pour les *Poaceae* et de 20 à 40g/kg de MS pour les *Fabaceae* soit une diminution de 20 à 40% des teneurs en matières azotées totales (MAT) (Tableau VI) (Demarquilly *et al.*, 1998).

En termes de qualité sanitaire, on peut penser qu'une dessiccation plus rapide, permettra l'obtention d'un foin moins poussiéreux et potentiellement moins contaminé par les organismes fongiques.

➤ A la récolte

D'autres pertes de matière sèche peuvent être observées à la récolte car le foin est sec et cassant à cette période. Il est préférable dans ce cas de réaliser le pressage lorsque l'humidité de l'air est maximale pour éviter toutes pertes supplémentaires (Vignau-Loustau & Huyghe, 2008). Elles peuvent atteindre de 3 à 10% voire 15% pour des andains peu fournis.

➤ Durant le stockage

Durant le stockage, d'autres pertes de MS peuvent survenir. Suite à une récolte du foin insuffisamment sèche (< 80 % MS), l'humidité relative de l'air au sein de la botte devient alors supérieure à 70 % et la température interne s'élève à plus de 20 °C, devenant ainsi un milieu propice au développement fongique. Un échauffement de la botte dû à la respiration de certaines cellules végétales encore vivantes et à l'activité des bactéries et moisissures est alors observé ce qui entraîne des réactions de Maillard entre les protéines et les sucres. Ces dernières rendent alors indigestibles les complexes formés. Dans ces conditions, une diminution des constituants intracellulaires tels que les sucres ou la matière azotée, ainsi qu'une augmentation des constituants pariétaux, sont observées (Vignau-Loustau & Huyghe, 2008).

Afin de réduire les pertes de MS engendrées par la respiration cellulaire, la teneur en eau du foin doit être inférieure à 15 %.

Pour réduire ces pertes, on peut: (i) diminuer le nombre de fanages et les réaliser sur du foin pas trop sec ; (ii) former des andains après la fauche-conditionnement afin d'améliorer la ventilation et réduire le nombre d'opérations mécaniques ; (iii) choisir des techniques et des retourneurs d'andains qui soient les moins traumatisants pour les plantes ou (iv) opter pour des méthodes de séchage alternatives telles que le séchage en grange qui permet de réduire le temps de séjour au sol du foin, de manipuler le foin encore humide réduisant ainsi les pertes de matières sèches et donc de digestibilité.

[¶]Voir Lexique page 199

Tableau VII : Concentrations moyennes d'*Absidia corymbifera*, *Eurotium amstelodami*, et de *Wallemia sebi* (exprimées en 10^3 CFU. g⁻¹) dans le foin présent dans les fermes à risque de FLD en fonction des pratiques culturales (n=71). Les mauvaises conditions de récolte correspondaient soit à un terrain inondable, une pluie durant la récolte ou une contamination par le sol du foin engendrée par la prolifération de campagnols. (D'après Roussel *et al.*, 2004).

Criteria	<i>A. corymbifera</i>			<i>E. amstelodami</i>			<i>W.sebi</i>		
	Moyenne (SD)	Mediane (min-max)	p	Moyenne (SD)	Mediane (min-max)	p	Moyenne (SD)	Mediane (min-max)	p
Conditions de récolte									
Bonnes	1,04 (8,9)	1,20 (0-56,5)	<0,001	10,79 (4,5)	8,70 (0,7-100,5)	0,02	9,06 (19,5)	13,33 (0-1706)	0,38 NS
Mauvaises †	5,01 (3,3)	5,75 (0,2-43)		31,19 (4,7)	35,00 (1,6-556)		7,09 (26,3)	5,55 (0,1574)	
Mode de stockage									
Balles cylindriques	2,38 (5,8)	2,48 (0-43)	0,06 NS	18,28 (4,9)	24,55 (0,7-556)	0,14 NS	7,19 (18,6)	8,77 (0-1706)	0,28 NS
En vrac	0,76 (13,2)	1,20 (0-56,5)		9,55 (4,5)	6,84 (0,8-72,5)		12,76 (31,8)	26,91 (0-429,5)	
Lieu de stockage									
A côté de l'étable	1,87 (8,5)	2,20 (0-56,5)	0,33 NS	16,10 (5,1)	24,38 (0,7-556)	0,60 NS	5,80 (19,80)	10,26 (0-456)	0,03
Au dessus de l'étable	1,30 (3,9)	1,90 (0,2-10,2)		12,16 (3,8)	10,89 (2,7-142,2)		70,14 (14,4)	146,56 (0-1706)	
Type de foin									
Première récolte	2,10 (6,3)	2,35 (0-43)	0,34 NS	21,18 (4,6)	30,76 (0,9-556)	0,03	6,90 (30)	12,00 (0-1574)	0,82 NS
Seconde récolte	1,28 (11,1)	1,35 (0,56,5)		8,37 (4,8)	10,09 (0,7-74,6)		12,10 (9,5)	13,30 (250-1706)	

† Les mauvaises conditions de récolte correspondaient soit à un terrain inondable, une pluie durant la récolte ou une contamination par le sol du foin dû à la prolifération de campagnols.

NS: non significatif

Suite à la prise de conscience des producteurs et avec un développement croissant de problèmes de santé animale liés à l'alimentation, l'amélioration de la qualité sanitaire est devenue au centre des préoccupations. Ainsi plusieurs solutions ont été proposées afin de réduire notamment la prolifération fongique.

III.4 Effets des pratiques culturelles sur la qualité sanitaire des foins

Les études réalisées sur le développement fongique jusqu'à ce jour, porte principalement sur l'effet des pratiques culturelles. La contamination fongique dépend de plusieurs facteurs à savoir les conditions climatiques lors de la récolte, la contamination par le sol et le taux d'humidité à la récolte, le mode de séchage ou de stockage et l'utilisation d'additifs de conservation.

III.4.1 Les conditions climatiques

Roussel *et al.* (2004) ont mis en évidence que de mauvaises conditions de récolte (pluie durant la récolte par exemple), entraînaient une augmentation de la contamination fongique et plus précisément d'*Absidia (Mycocladius) corymbifera* et d'*Eurotium amstelodami* dans le foin (Tableau VII), des espèces incriminées dans la maladie du poumon du fermier. Une autre étude réalisée au Japon, durant 20 ans, concernant l'impact des conditions météorologiques sur la prévalence de la maladie du poumon du fermier a montré que la température ainsi que le temps d'ensoleillement lors du séchage du foin et non la pluviométrie, déterminaient la contamination fongique du foin récolté (Takahashi *et al.*, 2002). Terho *et al.* (1987) ont montré que l'incidence de la maladie du poumon du fermier était positivement corrélée à la pluviométrie et négativement à l'ensoleillement et au nombre de jours sans pluie.

III.4.2 La contamination par le sol et les effets du taux d'humidité à la récolte

D'autres facteurs influencent la qualité sanitaire. Il s'agit de la contamination par le sol des foins qui peut entraîner une concentration microbiologique élevée, par exemple, de *Fusarium*, sans pour autant qu'il n'y ait de moisissures visibles (Roussel *et al.*, 2004) ou le taux d'humidité à la récolte qui est bien connu pour affecter le développement fongique (Grégory *et al.*, 1963). Les *Fusarium* sont connus pour être majoritairement présents dans le sol de prairies ou de grandes cultures (Bateman & Murray, 2001). Cette contamination par le sol peut provenir, par exemple, de l'activité des campagnols (Roussel *et al.*, 2004) ou des taupes.

[¶] Voir Lexique page 199

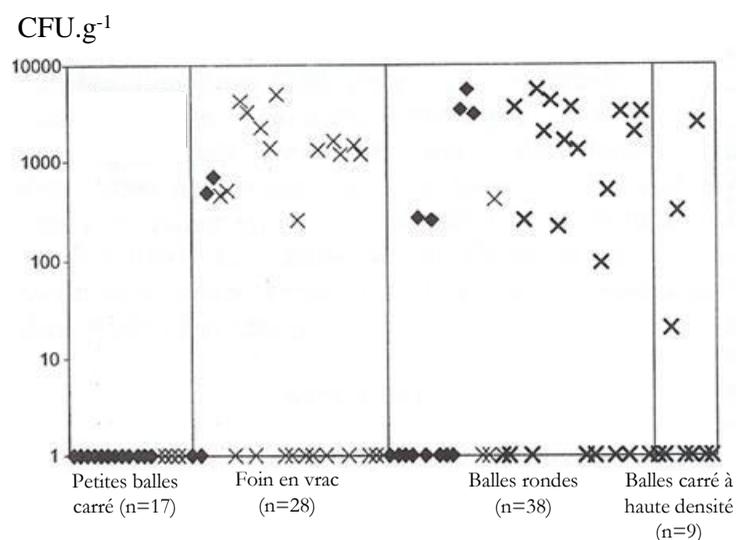


Figure 25 : Concentration en *Absidia corymbifera* dans le foin provenant de Finlande (n=29, ♦) et de France (n=63, x) selon la méthode de production de foin. (Reboux *et al.*, 2006).

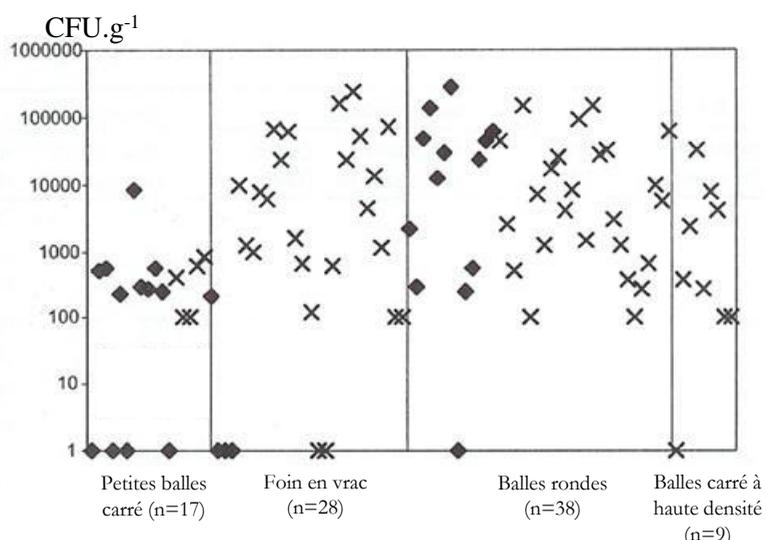


Figure 26 : Concentration en *Eurotium amstelodami* dans le foin provenant de Finlande (n=29, ♦) et de France (n=63, x) selon la méthode de production de foin. (Reboux *et al.*, 2006).

Tableau VIII : Nombre moyen de colonies d'Actinomycètes thermophiles, de micromycètes et de bactéries Gram- par boîte de Pétri pour chaque ferme étudiée. (D'après Dalphin *et al.*, 1991).

Fermes	Actinomycètes	Micromycètes	Bactéries Gram-	Fermes	Actinomycètes	Micromycètes	Bactéries Gram-
Séchage en grange avec chauffage				Balles de moyenne densité			
1*	0	28	0	19	4	1051	0
2	0	20	0	20†	6	214	1
3*	0	55	0	21	7	9	0
4	7	6	0	22	52	29	0
5*	7	116	0	23	56	37	1
6*	10	46	1	24†	139	20	0
7	39	9	0	25	934	67	0
8†	2628	791	0	26	2628	39	0
Médiane	7	37	-		54	38	-
Séchage en grange				Balles rondes			
9†	3	164	0	27	8	12	0
10	4	80	1	28	45	33	1
11	5	30	1	29	54	257	0
12	6	8	0	30	56	45	0
13	6	18	0	31	174	28	0
14	36	4	1	32	181	27	0
15	42	27	0	33	249	20	1
16	69	63	0	34†	983	44	0
17	72	329	0				
18†	1759	47	0				
Médiane	21	38	-		115	30	-

* Fermes modernes : séchage en grange avec chauffage, système de ventilation de l'étable, un râtelier central pour l'alimentation et une grange à distance de l'étable.

† Fermes avec la maladie du poumon du fermier

Comme cela a été vu précédemment, un foin récolté avec un taux d'humidité trop élevé, peut subir un échauffement et devenir un milieu propice au développement fongique.

III.4.3 Les modes de séchage et de stockage

Les modes de séchage et de stockage peuvent influencer la qualité sanitaire du foin. Un foin récolté en balles à faible densité présente une contamination fongique nettement plus faible que des balles rondes ou des balles à haute densité car ces 2 dernières ont, en général, un taux d'humidité durant le stockage plus élevé, favorisant ainsi la prolifération fongique (Reboux *et al.*, 2006). Ceci a notamment été vérifié sur *Absidia (Mycocladus) corymbifera* et *Eurotium amstelodami* (Figure 25 et 26) impliquées dans la maladie 'du poumon du fermier'. Cette même étude a montré qu'un foin récolté et conservé en vrac permettait de réduire la prolifération fongique notamment d'*Absidia (Mycocladus) corymbifera* par rapport aux balles rondes (Reboux *et al.*, 2006) (Figure 25 et 26).

Dalphin *et al.* (1991) ont comparé différents modes de stockage et de séchage du foin : séchage en grange avec chauffage, séchage en grange simple, balles à moyenne densité et balles rondes. Il a ainsi démontré que l'utilisation d'un séchage en grange permettait de réduire la contamination par les actinomycètes thermophiles des foins. Un séchage en grange additionné d'un courant d'air chaud permettrait de réduire encore plus la contamination fongique (Tableau VIII). Le séchage en grange apparaît donc comme une bonne alternative pour améliorer la qualité sanitaire des foins, cependant l'installation et le coût d'usage de ce système de séchage peuvent constituer un frein pour un tel investissement.

III.4.4 Les additifs de conservation

Quatre types de produits sont disponibles sur le marché :

- Les acides supposés inhibés le développement des moisissures tels que l'acide propionique, l'acide acétique et l'acide lactique.
- Des bactériesensemencées sur le fourrage permettant une fermentation lactique plus efficace et rapide devenant ainsi un milieu peu propice au développement fongique.
- Les enzymes fibrolytiques (cellulase, hémicellulase, pectinase) ou amylolytiques (amylase) qui permettent de dégrader les sucres complexes non utilisables par les bactéries lactiques, en sucres simples qui vont être utilisés pour produire de l'acide lactique. Ces enzymes sont généralement ajoutées aux bactéries lactiques.

[¶] Voir Lexique page 199

- Les sels qui permettent de réduire le temps de séchage du foin au champ mais aussi d'agir comme agent microbien et d'éviter un échauffement au sein de la botte lors du stockage, notamment ceux contenant du soufre. En effet, lorsque les sulfites sont dissous dans l'eau, il se forme alors du dioxyde de soufre qui va agir comme un agent antimicrobien. Son efficacité est augmentée lorsque le pH est bas (Ouellet & Lafrenière, 2005).

Les additifs de conservation ont principalement été développés pour les ensilages afin i) d'éliminer les fermentations indésirables, ii) de réduire la protéolyse, iii) de prévenir la prolifération fongique aérobie ainsi que la dégradation de la qualité nutritive lorsque l'ensilage est exposé à l'air et iv) d'augmenter la stabilité aérobie de l'ensilage (Kung *et al.*, 1998 et 2003a). Sous nos latitudes, les conditions climatiques ne permettent pas toujours de récolter du foin à 85% de MS, le foin peut être récolté avec un taux d'humidité élevée entraînant une réduction de la teneur en énergie et de la digestibilité des protéines mais également une augmentation de la contamination fongique et des poussières (Gregory *et al.*, 1963 ; Robertson, 1983). Des additifs de conservation pour le foin ont alors été développés. Le plus souvent, ces additifs sont appliqués lors du pressage, les distributeurs d'additifs étant accrochés aux presses. La dose d'additif appliquée est dépendante du taux de matière sèche du fourrage.

Reboux *et al.* (2002) ont mis en évidence que l'utilisation d'acide propionique permettait de réduire de 40% la contamination fongique. Baron & Greer (1988) ont également montré que les additifs contenant de l'acide propionique étaient plus efficaces contre l'échauffement du foin et la contamination fongique que d'autres additifs comme les bactéries lactiques ou l'acide lactique directement et le sulfate de sodium. Ces mêmes auteurs ont observé que l'ajout de bactéries lactiques ou d'acide lactique, sur un foin récolté à 25% d'humidité, ne réduisait pas la croissance des moisissures. Les bactéries ont certainement besoin d'un taux d'humidité plus élevé pour fonctionner correctement. D'après Duchaine *et al.* (1995), les bactéries lactiques, comme *Pediococcus pentosaceus*, présentent une forte croissance lorsque le foin a un taux d'humidité de 35% à la récolte. Malgré cette forte croissance, cet inoculum bactérien ne permet pas de réduire la contamination fongique. Pour les bactéries, le taux d'humidité à la récolte ne semble donc pas être le seul facteur influençant l'efficacité de l'inoculum. L'efficacité des bactéries lactiques sur la qualité sanitaire des foins est donc à discuter mais aussi celle du sel. En effet, d'après Roussel *et al.* (2005), le sel ne permettrait pas de réduire significativement la contamination fongique comparée à du foin non traité.

[¶] Voir Lexique page 199

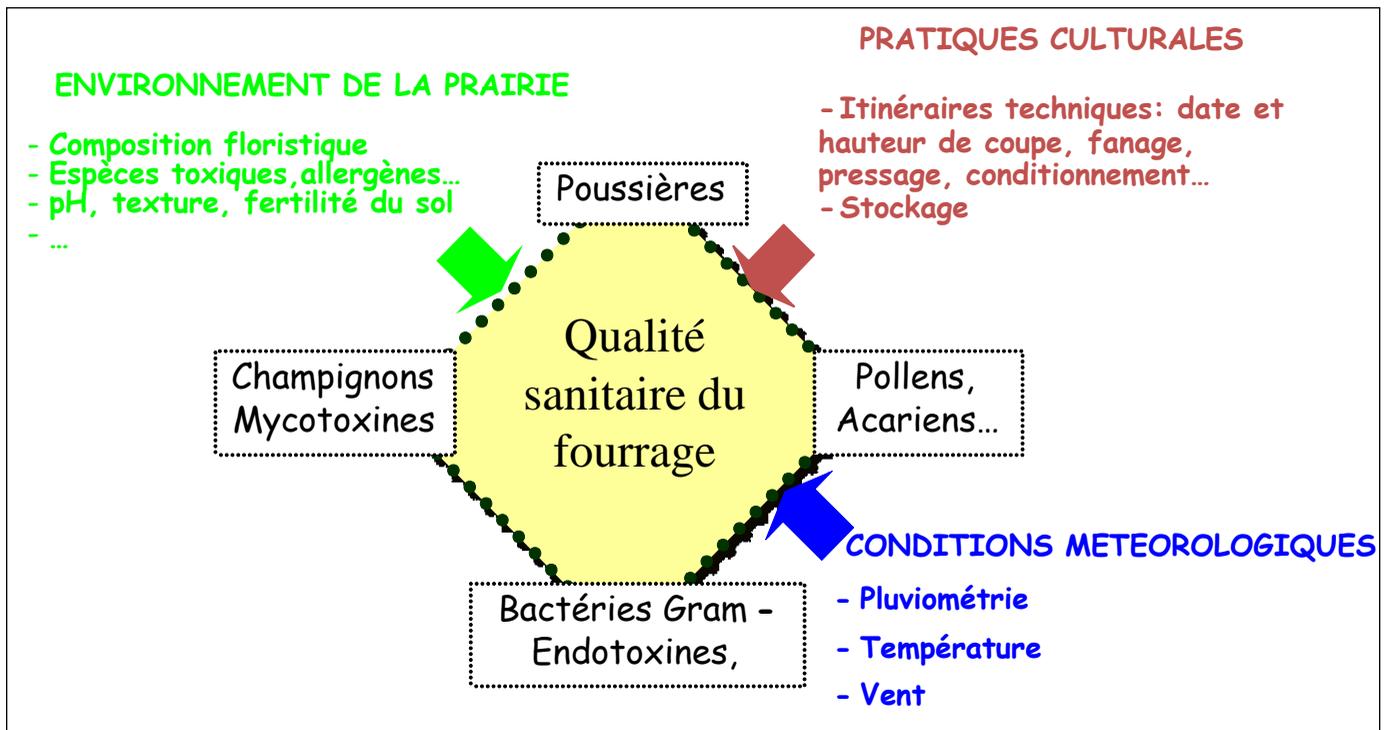


Figure 27 : Schéma récapitulatif issu de l'analyse bibliographique montrant les facteurs principaux pouvant influencer la qualité sanitaire et plus spécifiquement les éléments qui la définissent : les champignons et mycotoxines, les poussières, les pollens et acariens et les bactéries Gram négatif et endotoxines.

IV. Objectifs de la thèse

Les maladies pulmonaires équine constituent un réel problème pour les éleveurs équine, en particulier, la MORVR qui peut affecter plus de 50 % du cheptel équin dans certaines régions. Le traitement de cette maladie et sa prévention ne sont pas toujours efficaces et restent problématiques. Une meilleure maîtrise de la qualité sanitaire des foin paraît pertinente mais devra nécessairement passer par une meilleure connaissance des processus impliqués dans cette qualité.

Le rôle des pratiques culturelles sur la qualité nutritive du foin est aujourd'hui bien connu (Jones, 1979 ; Jones & Prikett, 1981 ; Savoie *et al.*, 1994 ; Demarquilly *et al.*, 1998 ; Vignau-Lousteau & Huyghe, 2008). En revanche, peu d'études se sont intéressées aux effets des pratiques culturelles sur la qualité sanitaire des foin et seuls quelques éléments ponctuels concernant les conditions climatiques (Takahashi *et al.*, 2002), quelques pratiques culturelles telles que l'utilisation des additifs de conservation (Reboux *et al.*, 2002), les modes de séchage (Dalphin *et al.* 1991), les modes de stockage (Vandenput *et al.* 1997) ou encore la densité de pressage (Reboux *et al.* 2006) sont disponibles.

Dans ce contexte, l'objectif principal de la thèse consiste, après avoir développé de façon quantitative une évaluation de la qualité sanitaire du fourrage équin, à déterminer les facteurs et les mécanismes qui l'affectent majoritairement, pour améliorer sa qualité sanitaire et à termes réduire la prévalence de la MORVR.

A la suite de cette analyse bibliographique (Figure 27), plusieurs hypothèses ont été formulées et ont guidées nos démarches expérimentales :

- 1) La qualité sanitaire du fourrage équin, établie en fonction des facteurs de risque de la MORVR, peut être quantifiée suffisamment précisément pour effectuer des études comparatives.**

- 2) Certaines pratiques culturelles sont susceptibles d'affecter positivement ou négativement cette qualité sanitaire.** Nous avons recherché, en particulier si :
 - La gestion de la prairie (pâturage préalable ou non, présence ou non de taupinières) peut être optimisée en vue d'une meilleure qualité
 - Une fauche tardive (à l'anthèse des *Poaceae*) accroît la quantité de pollen et à contrario, une coupe des regains permet de limiter leur présence
 - La hauteur de coupe et le nombre de fanage affectent le degré de contamination du foin

[¶] Voir Lexique page 199

- Une forte humidité du fourrage à la récolte et lors de la conservation (foin récolté insuffisamment sec, enrubannage), modifie la présence de poussières respirables et des spores fongiques
- Le taux de pressage du foin affecte son humidité résiduelle et donc la multiplication des organismes fongiques
- Certains itinéraires techniques peuvent améliorer la qualité sanitaire du foin (technique de fanage, séchage en grange ventilé ou non, enrubannage, additifs de conservation)
- Le foin sec présente au cours de son stockage une évolution de sa qualité sanitaire

3) La composition floristique de la prairie peut conditionner en partie la qualité sanitaire du foin

4) Les conditions météorologiques défavorables à la récolte affectent la qualité sanitaire du foin

5) Les poussières respirables peuvent contenir des mycotoxines

A partir de ces hypothèses, le travail de thèse s'est alors organisé autour de trois axes de recherche principaux :

I) L'évaluation de la qualité sanitaire des foins *via* la quantification et la caractérisation biologiques des poussières respirables (diamètre inférieur à 5 μm) présentes dans les foins. Cette étape passe par la mise au point des méthodologies requises pour évaluer la qualité sanitaire c'est-à-dire la quantification et l'identification des poussières, des spores fongiques, des mycotoxines, des endotoxines ainsi que des pollens. Les mises au point ont été réalisées sur des foins de qualités sanitaires contrastées afin de mettre en évidence l'existence de différences significatives permettant ainsi de valider les méthodologies développées.

Puis une fois ces méthodologies développées, le second axe de recherche était alors centré sur :

II) L'identification des facteurs influençant fortement la qualité sanitaire des foins. Pour cela, trois groupes de facteurs à savoir, les pratiques culturales, la composition floristique et les conditions météorologiques ont été appréhendés au travers de deux expérimentations :

[¶] Voir Lexique page 199

➤ **L'analyse expérimentale de l'impact de pratiques culturales et de facteurs climatiques sur la qualité des fourrages (2007-2009).**

Une prairie homogène par sa composition floristique a alors été subdivisée en plusieurs blocs sur lesquels étaient testés différentes pratiques ou conditions culturales. La deuxième année de production a permis de confirmer ou non les résultats obtenus lors de la première année de production et de tester l'effet d'autres pratiques culturales sur la qualité sanitaire comme l'utilisation d'additifs de conservation.

➤ **Analyse de l'impact conjoint de la composition floristique des prairies et des pratiques culturales sur la qualité sanitaire du foin (2008-2009).**

Pour cela, des foins mono-spécifiques d'espèces prairiales typiques de Basse-Normandie comme *Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, *Alopecurus geniculatus* et *Poa trivialis* ainsi que des fourrages commercialisés pour l'alimentation équine se différenciant par leurs compositions floristiques, leurs itinéraires techniques ou encore de leurs lieux de production ont été analysés.

III) La hiérarchisation des facteurs pouvant influencer la qualité sanitaire. Pour cela, une analyse statistique de l'ensemble des données issues des différentes expérimentations sera réaliser afin de hiérarchiser l'ensemble des facteurs pris en compte susceptibles de déterminer la qualité sanitaire afin de proposer en première approche des stratégies capables d'améliorer cette qualité sanitaire du fourrage équin, tout en dégagant des perspectives de recherches qui apparaissent les plus pertinentes. Ceci permettra également de rédiger un article supplémentaire de synthèse et de vulgarisation dans une revue telle que *Fourrages* et s'intitulera :

- **Effet des pratiques culturales sur la qualité sanitaire et nutritive des fourrages.**
SEGUIN Virginie, GARON David, LEMAUVIEL-LAVENANT Servane, BOUCHART Valérie, GALLARD Yves, BLANCHET Benoit, DIQUELOU Sylvain, PERSONENI Emmanuelle, GAUDUCHON Pascal, OURRY Alain.

[¶] Voir Lexique page 199

MATERIELS & METHODES

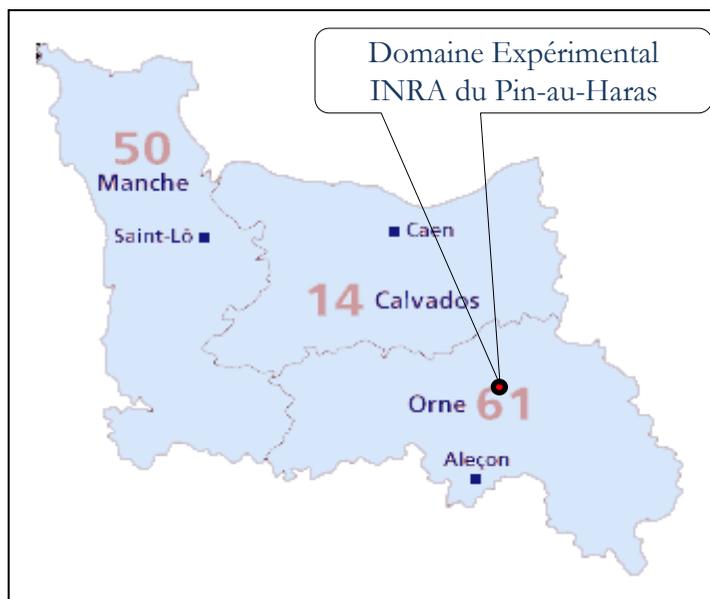


Figure 28 : Situation géographique du domaine expérimental INRA du Pin-au-Haras, en Basse-Normandie.

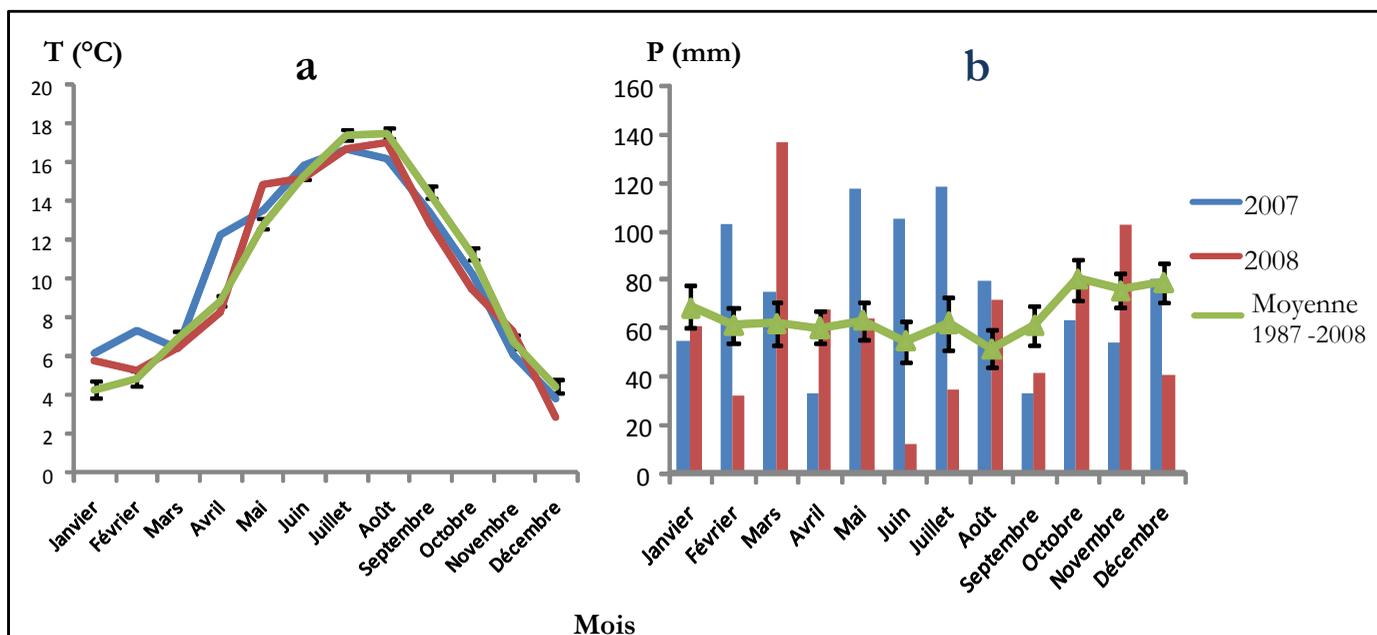


Figure 29 : Pluviométrie et température moyennes des 20 dernières années (1987-2008) accompagnées de la pluviométrie et des températures relevées durant l'année 2007 et 2008 correspondant, respectivement, à la première et seconde année de production expérimentale de foin.

MATERIELS & METHODES

I. Production expérimentale de foins

Ce travail de doctorat a nécessité d'une part de mettre en place des parcelles expérimentales sur lesquelles différents traitements ont été appliqués, et d'autre part de produire des foins monospécifiques afin d'étudier l'impact de pratiques culturales, de certaines conditions environnementales, de la composition floristique mais également d'additifs sur la qualité sanitaire des fourrages.

I.1 Dispositifs expérimentaux

I.1.1 Site d'étude

Cette expérimentation a été réalisée au sein du Domaine Expérimental INRA du Pin-au-Haras (61) situé en Basse-Normandie (48°77N, 0°13'W, 205 m) (Figure 28). Le paysage de cette région se caractérise par un réseau de haies denses intégrant essentiellement des prairies semées et permanentes destinées à l'alimentation animale par pâturage ou production de fourrages (foin, ensilage, enrubanné). Les prairies et cultures fourragères de cette région existent depuis l'implantation des haras nationaux, il y a plus de 3 siècles.

Le Domaine Expérimental INRA du Pin compte 430 ha de prairies naturelles ou semées et de cultures fourragères telles que le maïs.

I.1.2 Climat

Ce site présente un climat océanique tempéré et humide avec une faible amplitude thermique. La température annuelle moyenne de ces 20 dernières années avoisine 10.45 °C avec une température moyenne minimale de 4.31 °C en Janvier et une température moyenne maximale de 17.54 °C en Août (Figure 29a). La pluviométrie annuelle moyenne au cours des 20 dernières années a été d'environ 779 mm (Figure 29b).

La production de foins plurispécifiques a été réalisée deux années consécutives, 2007 et 2008 alors que la production de foins mono-spécifiques n'a été réalisée qu'en 2008.

En 2007, la température annuelle moyenne était de 10.71 °C (Figure 29a) et la pluviométrie annuelle moyenne était d'environ 913 mm (Figure 29b). Les conditions

Tableau IX : Relevé floristique de la prairie utilisée pour la production expérimentale de foin. Coefficients d'abondance / dominance (A/D) de Braun-Blanquet (1964).

Espèces	Coefficient d'A/D
<i>Alopecurus geniculatus</i>	4
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	+
<i>Bromus hordeaceus</i>	1
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	+
<i>Cerastium fontanum</i>	1
<i>Cirsium vulgare</i>	+
<i>Dactylis glomerata</i>	1
<i>Geranium dissectum</i>	+
<i>Holcus lanatus</i>	3
<i>Lolium perenne</i>	1
<i>Poa trivialis</i>	5
<i>Ranunculus acris</i>	+
<i>Ranunculus repens</i>	3
<i>Rumex crispus</i>	1
<i>Rumex obtusifolius</i>	1
<i>Sonchus asper</i>	0
<i>Taraxacum officinale</i>	2
<i>Trifolium pratense</i>	+
<i>Trifolium repens</i>	2

Tableau X : Analyse du sol de la prairie du Pin-au-Haras, utilisée pour les expérimentations.

		Concentration
Granulométrie	Argile (<2µm)	174 g/kg
	Limons fins (2/20µm)	231 g/kg
	Limons grossiers (20/50µm)	328 g/kg
	Sables fins (50/200µm)	229 g/kg
	Sables grossiers (200/2000µm)	38 g/kg
	Carbone total	36,6 g/kg
	Azote total	2,98 g/kg
	pH (KCl)	6,44
	Phosphore (P2O5)	0,105 g/kg
	CEC (Metson)	13,8 cmol+/kg
	Potassium (K)	1,39 cmol+/kg
	Potassium (K2O)	0,655 g/kg
	Potassium (K)	0,544 g/kg
	Azote nitrique (N de NO3)	3,94 mg/kg
	Azote ammoniacal (N de NH4)	7,09 mg/kg
	Soufre (soluble dans l'eau)	60,5 mg/kg

météorologiques de l'été 2007 ont été exceptionnelles car en 3 mois (de mai à juin), il est tombé 340 mm de pluie au lieu de 180 mm en moyenne sur les 20 dernières années (Figure 29b).

En 2008, la température et la pluviométrie annuelles moyennes avoisinaient celles des 20 dernières années, à savoir 10.17 °C et 743 mm (Figure 29a et b).

1.1.3 La prairie étudiée

Une prairie permanente homogène de 4.96 ha a été utilisée pour cette expérimentation. Elle est dominée par *Poa trivialis*, *Alopecurus geniculatus*, *Holcus lanatus*, *Ranunculus repens*, *Trifolium repens* et *Lolium perenne* (Tableau IX) et présente donc une flore typique des prairies Bas-Normandes (Diquélou *et al.*, 2003). Cette prairie est située sur une pente faible et est drainée.

Le sol de cette prairie est constitué de limons moyens sableux, présentant un niveau de matière organique faible (Tableau X). Il présente un pH neutre, un bon niveau d'azote nitrique ainsi qu'une capacité d'échange cationique assez élevée (Tableau X).

Cette parcelle est habituellement soumise à un chaulage à hauteur 1,6 tonne/ha tous les 4 ans, en alternance avec une fertilisation organique (16 à 18 t/ha) apportée tous les 2 ans, une fertilisation azotée annuelle de 150-180 Kg N/ha avec 60-80 kg N apportés au printemps, le reste en 2 apports fractionnés après chaque coupe. Un désherbage chimique annuel des adventices et une destruction des taupinières sont également réalisés. Concernant la production de foin, une première coupe à 5 cm au moment de l'anthèse c'est-à-dire début Juillet en général (en fonction des conditions météorologiques) et une coupe des regains à 45 jours sont effectuées. Après la coupe, la prairie est fanée une première fois, puis une à deux fois par jours, selon les conditions météorologique jusqu'à la récolte du foin au pourcentage de matière sèche désiré soit 85 % pour un foin sec, 75% pour un foin mal séché ou 65 % pour l'enrubannage.

1.1.4 Foins plurispécifiques

1.1.4.1 Première année de production (2007)

a. Mise en place des parcelles

Les parcelles ont été délimitées le 12 mars 2007 avec une structuration en 15 blocs de 650 m² (120 m * 5.5 m) permettant une mécanisation optimale. Les blocs étaient séparés les uns des autres par des couloirs tampon de 1.20 m afin d'éviter des contaminations éventuelles entre les différents traitements.

b. Traitements appliqués

Sur chaque bloc, différents traitements ont été appliqués. Parmi ces traitements, certains concernaient la période de récolte, le mode de récolte, les conditions de croissance du fourrage, d'autres les conditions de récolte ou encore la présence de perturbation ou antécédents de la prairie telle que la présence de taupinières.

- Les conditions de croissance

- Application ou non d'une **fertilisation azotée** : Certains blocs ont été fertilisés à hauteur de 60 à 80 kg N/ha et d'autres, non.

- La période de récolte

- **Période précoce.** Le foin est récolté en début d'épiaison c'est-à-dire fin Mai/début Juin. Cette pratique est employée par les haras. A cette période le foin devrait présenter une bonne qualité nutritive.

- **Période tardive.** Le foin est récolté lorsque les *Poaceae* sont en fin d'épiaison. Cette période se situe fin Juillet/début Août. Cette pratique est utilisée par la plupart des exploitants agricoles.

Certains traitements étaient testés, à la fois pour une récolte précoce et une récolte tardive tels que l'obtention d'un foin enrubanné.

- Le mode de récolte

- **Foin conventionnel récolté à 85%MS** correspondant à une valeur optimale pour un foin sec.

- **Foin conventionnel récolté à 75%MS** représentant un produit insuffisamment sec résultant par exemple d'une récolte sous une menace météorologique pouvant ainsi favoriser le développement fongique et la production de poussière.

- **Enrubannage** correspondant à un foin récolté à 60-70% de matière sèche (MS) puis enrubanné. Le foin enrubanné est un fourrage conservé humide.. Ce mode de stockage est de plus en plus employé par les éleveurs équins.

- **Foin récolté à environ 60% de MS puis séché en grange** jusqu'à 85%MS. Cette technique permet de réduire le temps de séchage au sol et d'améliorer le séchage. Cette technique peut ainsi, potentiellement, réduire la prolifération fongique. Le séchage en grange a été effectué

au Domaine Expérimental INRA du Pin-au-Haras. Le séchoir est équipé d'un déshumificateur et d'un générateur d'air chaud électrique à 25°C minimum.

- **Regain** : La parcelle 'Témoin' (récolte précoce) a subi une seconde coupe 40 jours environ après la première coupe. En l'absence de floraison lors de cette seconde coupe, la contamination en poussière ainsi qu'en pollen devrait ainsi être plus faible.

- Les conditions de récolte

- **Hauteur de coupe** conventionnelle à **5 cm**
- **Hauteur de coupe** basse à **3 cm** pouvant entraîner une contamination par le sol du foin.

- **Hauteur de coupe** haute à **7 cm** pouvant faciliter le séchage et permettre ainsi de réduire la prolifération fongique. Néanmoins cette technique entraîne une baisse du rendement.

- **Simulation** d'une **pluie après coupe** de 2*10mm apportée 24 et 48 h après la coupe. Ce traitement va simuler de mauvaises conditions météorologiques au cours du séchage pouvant favoriser le développement fongique et la production de poussière. Cette simulation a été réalisée à l'aide d'une rampe d'arrosage reliée à une tonne à lisier. Des essais préliminaires ont permis de déterminer le volume d'eau à répandre ainsi que la vitesse de répartition pour aboutir à une pluie de 10 mm tout au long de l'andain.

- **Premier fanage 48 h après la coupe.** Cette pratique est couramment employée dans les haras qui font appels à des entreprises agricoles. Dans ces conditions, le foin ne peut sécher correctement durant deux jours ce qui peut favoriser une prolifération fongique.

- Foin récolté à un **niveau de pressage supérieur (135 versus 115 kg.m⁻³)**. Un pressage trop important du foin peut entraîner un mauvais séchage lors du stockage, un échauffement au sein de la botte et donc favoriser le développement de poussière ainsi que de champignons.

- Perturbations potentielles ou antécédents culturaux

- **Simulation de taupinières.** Généralement les taupinières sont éliminées par les exploitants agricoles car leur présence sur la parcelle peut augmenter la quantité de poussière au sein du fourrage et permettre le développement d'espèces fongiques telluriques. Pour cela, 1 taupinière d'environ 4.5 dm³ a alors été disposée tous les 10 m² tout au long de la parcelle le 26 mars 2007. Les taupinières ont été prélevées au sein du Domaine Expérimental INRA du Pin-au-Haras afin d'avoir le même sol que celui de la prairie.

Tableau XI : Tableau récapitulatif des parcelles 2007 accompagnées de leurs traitements respectifs.

N° Parcelle	Noms des parcelles	Période de récolte	Hauteur de coupe	Densité des balles	% de MS au pressage	Mode de séchage	Mode de stockage	Autres
A	Témoin	Précoce	5 cm	115 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	Φ
B	Pas de fertilisation	Précoce	5 cm	115 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	Pas de fertilisation azotée
C	Séchage en grange	Précoce	5 cm	115 kg.m ⁻³	60	en grange	Petite botte carrée	Φ
D	Enrubannage	Précoce	5 cm	115 kg.m ⁻³	60/70	au champ	Enrubanné	Φ
E	Témoin	Tardive	5 cm	115 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	Φ
F	Pas de fertilisation	Tardive	5 cm	115 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	Pas de fertilisation azotée
G	Coupe à 3 cm	Tardive	3 cm	115 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	Φ
H	Coupe à 7 cm	Tardive	7 cm	115 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	Φ
I	Taupinières	Tardive	5 cm	115 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	Taupinières tous les 10 m ²
J	Crottins	Tardive	5 cm	115 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	Crottins tous les 10 m ²
K	Niveau de pressage supérieur	Tardive	5 cm	135 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	Φ
L	Fanage tardif	Tardive	5 cm	115 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	1er fanage 48h après coupe
M	Récolte à 75%MS	Tardive	5 cm	115 kg.m ⁻³	75	au champ	Petite botte carrée	Φ
N	Pluie après coupe	Tardive	5 cm	115 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	2*10 mm de pluie à 24 et 48 h après coupe
O	Enrubannage	Tardive	5 cm	115 kg.m ⁻³	60/70	au champ	Enrubanné	Φ
A	Regain		5 cm	115 kg.m ⁻³	85	au champ	Petite botte carrée	Seconde coupe

- **Apports de crottins de cheval.** La présence de crottins sur la parcelle simule un pâturage équin avant la mise en place de la fauche et augmente la quantité de matière organique. La présence de crottins au sein de la parcelle peut entraîner la prolifération d'espèces fongiques spécifiques à ce genre de substrat. Tout comme les taupinières, un crottin de cheval d'environ 4.5 dm³ était disposé tout les 10 m² sur la parcelle le 26 mars 2007. Les crottins provenaient de la Jumenterie du haras du Pin située à proximité du Domaine expérimentale INRA du Pin.

Le tableau XI récapitule le dispositif expérimental:

-Parcelles de la récolte précoce

Parcelle A : **Témoin récolte précoce et Regain**

Parcelle B : **Absence de fertilisation azotée**

Parcelle C : **Séchage en grange**

Parcelle D : **Enrubannage**

-Parcelles de la Récolte tardive

Parcelle E : **Témoin récolte tardive**

Parcelle F : **Absence de fertilisation azotée**

Parcelle G : **Coupe à 3 cm**

Parcelle H : **Coupe à 7 cm**

Parcelle I : **Taupinières**

Parcelle J : **Crottins**

Parcelle K : **Niveau de pressage supérieur**

Parcelle L : **Fanage tardif.**

Parcelle M : **Récolte à 75%**

Parcelle N : **Pluie de 2 * 10mm 24 et 48 h après coupe**

Parcelle O : **Enrubannage**

c. Récolte et échantillonnage

Avant de procéder à la mise en botte du foin sec ou de l'enrubannage ou encore du séchage en grange, le taux de matière sèche désiré était évalué au champ à l'aide d'une sonde permettant de déterminer le taux d'humidité dans l'andain (humidimètre pour fourrage WILE 5 et sonde destinée au foin, Gaston Richard, Sainte Julie, Canada).

La récolte précoce s'est déroulée du 4 au 9 juin 2007 et 4 traitements ont été récoltés : **témoin, séchage en grange, enrubannage** et **absence de fertilisation**. L'enrubanné a été récolté le 6 juin 2007 tout comme le foin séché en grange qui a été récolté à l'aide d'une auto

chargeuse puis placé en vrac dans le séchoir. Les deux autres parcelles ont été récoltées le 9 juin 2007.

Du fait des conditions météorologiques très atypiques de l'été 2007 (Figure 29b), la récolte tardive s'est déroulée du 26 au 31 juillet 2007 et non fin Juin comme cela était prévu. Pour cette récolte, 11 traitements ont été récoltés : **témoin, absence de fertilisation, coupe à 3 cm, coupe à 7 cm, taupinières, crottins, niveau de pressage supérieur, fanage tardif, récolte à 75% MS, Pluie après coupe et enrubannage.**

La simulation d'une pluie après coupe a donc été réalisée le 27 et 28 juillet 2007. La parcelle « **enrubannage** » a été récoltée le 28 juillet 2007. La parcelle « **récolte à 75 % MS** » a, quant à elle, été récoltée le 30 juillet 2007. Enfin les autres parcelles ont été andainées puis pressées le 31 juillet 2007.

La seconde coupe de la parcelle témoin de la récolte précoce a été réalisée du 27 au 30 Août 2007 soit 84 et non 50 jours après la première coupe comme cela été prévu à cause des mauvaises conditions météorologiques.

Lors de chaque récolte, 6 bottes de foin étaient échantillonnées selon un protocole régulier. La parcelle mesurant 120 m de long, une botte était étiquetée tous les 20 mètres. Les bottes étaient ensuite relevées afin qu'elles finissent de sécher au champ puis stockées dans une étable au sein du Domaine jusqu'à leur analyse en laboratoire.

Pour certains traitements, notamment pour les parcelles **témoin** ainsi que les parcelles qui ont été récoltées sous forme **d'enrubannage**, 6 autres bottes ont été récoltées et étiquetées afin d'étudier l'effet du temps de stockage sur la qualité sanitaire des fourrages.

I.1.4.2 Deuxième année de production (2008)

Cette seconde année d'expérimentation avait pour objectif d'une part de confirmer ou infirmer les résultats obtenus au cours de la première année, dont il faut le souligner, les conditions météorologiques étaient exceptionnelles, et d'autre part à tester de nouveaux traitements tels que l'ajout d'additifs permettant une meilleure conservation du foin en limitant le développement fongique (acide propionique, bactéries lactiques) ou un nombre plus élevé de fanage permettant à priori un meilleur séchage du foin.

Tableau XII : Tableau récapitulatif des parcelles 2008 accompagnées de leurs traitements respectifs.

N° des parcelles	Noms des parcelles	Période de récolte	% de MS au pressage	Mode de séchage	Mode de stockage	Autres
1	Pluie avant coupe	Précoce	85	au champ	Petite botte carrée	10 mm de pluie le matin avant la fauche
2	Enrubannage	Précoce	60/70	au champ	Enrubanné	Φ
3	Séchage en grange	Précoce	60	en grange	Petite botte carrée	Φ
4	Témoin	Précoce	85	au champ	Petite botte carrée	Φ
5	Fanages supplémentaires	Précoce	85	au champ	Petite botte carrée	3 fanages supplémentaires
6	Bactéries lactiques	Précoce	85	au champ	Petite botte carrée	Ajout de Bactéries lactiques avant pressage
7	Récolte à 75 % MS	Précoce	75	au champ	Petite botte carrée	Φ
8	Bactéries lactiques + Récolte à 75 % MS	Précoce	75	au champ	Petite botte carrée	Ajout de Bactéries lactiques avant pressage
9	Acide propionique	Précoce	85	au champ	Petite botte carrée	Ajout d'acide propionique avant pressage
10	Acide propionique + Récolte à 75 % MS	Précoce	75	au champ	Petite botte carrée	Ajout d'acide propionique avant pressage
11	Pluie après coupe	Précoce	85	au champ	Petite botte carrée	2*10 mm de pluie à 24 et 48 h après coupe
12	Pluie avant coupe	Tardive	85	au champ	Petite botte carrée	10 mm de pluie le matin avant la fauche
13	Enrubannage	Tardive	60/70	au champ	Enrubanné	Φ
14	Fanage tardif	Tardive	85	au champ	Petite botte carrée	1er fanage 48h après coupe
15	Témoin	Tardive	85	au champ	Petite botte carrée	Φ
16	Récolte à 75%MS	Tardive	75	au champ	Petite botte carrée	Φ
17	Taupinières	Tardive	85	au champ	Petite botte carrée	Taupinières tous les 10 m²
18	Pluie après coupe	Tardive	85	au champ	Petite botte carrée	2*10 mm de pluie à 24 et 48 h après coupe
1	Regain		85	au champ	Petite botte carrée	Seconde coupe

a. Mise en place des parcelles

Pour cette deuxième année d'expérimentation, la prairie a été scindée en 18 blocs de 600 m² (120m * 5m) afin de faciliter la mécanisation. Les blocs étaient séparés par un couloir tampon de 2 m pour éviter des contaminations éventuelles entre les différents traitements.

b. Traitements appliqués

Durant cette seconde année d'expérimentation, seuls les traitements ayant eu le plus d'impact sur la qualité sanitaire des foins lors de la première année ont été reconduits. Ce sont: la récolte à 75% de MS, la simulation d'une pluie après coupe, le premier fanage 48h après coupe, l'enrubannage, le séchage en grange et la simulation de la présence de taupinières. Durant cette deuxième année de production, la période de récolte (précoce ou tardive) était également testée.

Les nouveaux traitements testés étaient une simulation d'une pluie avant coupe, un nombre de fanages supérieurs et l'utilisation d'additifs de conservation :

- **Simulation d'une pluie avant coupe de 10 mm** réalisée le matin précédent la fauche de la même façon que celle réalisée après la coupe.
- **Nombre de fanage supérieur.** Cette parcelle subira 3 fanages supplémentaires par rapport aux autres parcelles.
- **Additifs de conservation :** Acide propionique et bactéries lactiques. Ces additifs sont commercialisés afin de prévenir la prolifération fongique.

→L'acide propionique est commercialisé par la société autrichienne BIOMIN sous le nom de CleanGrain liquid. Ce produit est une combinaison d'acides tamponnés, non corrosifs, constitué d'acide propionique et de benzoate de sodium. Il a été appliqué à hauteur de 5 L par tonne de fourrage sec juste avant le pressage à l'aide d'un pulvérisateur à main. L'additif a été appliqué à la fois sur du foin récolté à 75% de MS et du foin conventionnel récolté à 85% de MS.

→Les bactéries lactiques qui sont des souches de *Lactobacillus buchneri* (6.10^{10} CFU.g⁻¹), ont été appliquées, après dissolution dans de l'eau, à hauteur de 20 g par tonne de fourrage sec. Cet additif a été appliqué juste avant le pressage à l'aide d'un pulvérisateur à main à la fois sur du foin récolté à 75% de MS et du foin conventionnel récolté à 85% de MS.

Le dispositif expérimental est synthétisé dans le tableau XII :

-Parcelles de la récolte précoce

Parcelle 1 : **Pluie de 10 mm avant coupe**

Parcelle 2 : **Enrubannage**

Parcelle 3 : **Séchage en grange**

Parcelle 4 : **Témoin récolte précoce + Regain**

Parcelle 5 : **Fanages supplémentaires**

Parcelle 6 : **Bactéries lactiques**

Parcelle 7 : **Récolte à 75 % MS.**

Parcelle 8 : **Récolte à 75 % MS + Bactéries lactiques**

Parcelle 9 : **Acide propionique**

Parcelle 10 : **Récolte à 75 % MS + Acide propionique**

Parcelle 11 : **Pluie de 2 * 10 mm 24 et 48 h après coupe**

-Parcelle de la récolte tardive

Parcelle 12 : **Pluie de 10 mm avant coupe**

Parcelle 13 : **Enrubannage**

Parcelle 14 : **Fanage tardif.**

Parcelle 15 : **Témoin récolte tardive**

Parcelle 16 : **Récolte à 75 % MS.**

Parcelle 17 : **Taupinières**

Parcelle 18 : **Pluie de 2 * 10mm 24 et 48 h après coupe**

c. Récolte et échantillonnage

Durant cette seconde année d'expérimentation, la hauteur de coupe ainsi que la densité de pressage étaient semblables pour tous les traitements, c'est-à-dire, respectivement, 5 cm et environ 115 kg.m⁻³. La récolte précoce a eu lieu du 7 au 10 juin 2008. **L'enrubannage** et le foin qui est **séché en grange** ont été récoltés le 9 juin 2008. Les autres parcelles ont été récoltées le 10 juillet 2008 : les foins **récoltés à 75 % MS** en fin de matinée et les foins **récoltés à 85 % MS**, en soirée. L'irrigation après coupe a été réalisée le 8 et 9 juin 2008 et celle avant coupe a été réalisée le matin du 7 juin avant la fauche

La récolte tardive s'est déroulée du 15 au 18 juillet 2008. L'enrubanné et le foin **récolté à 75 % MS** ont été pressés le 17 juillet 2008, en milieu d'après-midi pour le premier et en soirée pour le second. Les arrosages ont été effectués le 15 juillet au matin pour la parcelle **simulation d'une pluie avant coupe** et le 16 et 17 juillet pour la parcelle **simulation d'une pluie après coupe**. Le reste des parcelles a été récolté le 18 juillet 2008.

Les regains ont été récoltés tardivement, du 4 au 7 septembre 2008 du fait de la faible repousse de la prairie.

Lors de cette deuxième année de production, des échantillons de foin ont été prélevés après la fauche, au pressage ainsi qu'au moment de l'analyse des poussières afin de mesurer l'évolution du taux de matière sèche et de comparer nos données à celle de la sonde au pressage. Pour chaque parcelle, 5 échantillons ont été prélevés tout long de la parcelle puis séchés à l'étuve à 60°C jusqu'à masse constante (Tableau XIII). Lors de la récolte précoce, les taux de matière sèche étaient généralement en dessous de ceux indiqués par la sonde au moment du pressage. A l'inverse les taux de MS lors de la récolte tardive étaient bien en accord avec les taux indiqués par la sonde sur le terrain. Hormis l'enrubannage qui est conservé humide, tous les autres foins ont atteint 85 % de MS voire plus durant le stockage.

Concernant l'échantillonnage et le stockage, les méthodes employées étaient les mêmes qu'en 2007. Les parcelles dont 6 bottes supplémentaires ont été échantillonnées pour étudier l'effet de la conservation, étaient les deux parcelles témoins, les parcelles récoltées à 75% de MS ayant reçu les additifs ainsi que leur témoin c'est-à-dire les parcelles récoltées à 75% de MS.

I.1.5 Foins monospécifiques

Cette expérimentation a consisté à récolter différents foins mono-spécifiques afin de déterminer si la composition floristique influait sur la qualité des fourrages.

I.1.5.1 Espèces récoltées

Cinq espèces typiques des prairies permanentes Bas-Normandes et les plus abondantes sur les prairies du Domaine Expérimental du pin-au-Haras ont été choisies : *Alopecurus geniculatus*, *Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Poa trivialis* et *Trifolium repens* (Figure 30). Les foins contenant de la houlque laineuse, *Holcus lanatus*, sont généralement évités par les éleveurs équins qui lui reprochent d'être poussiéreux.

I.1.5.2 Récolte

Les différentes espèces ont été récoltées le 26 et 27 mai 2008 sur la prairie permanente servant à la production expérimentale de foins précédemment décrite.

Pour chaque espèce, 3 réplicats de 1,5 kg de masse fraîche ont été fauchés à la main, à 5 cm du sol, triés puis séchés sur le sol. Chaque réplicat a été fané une fois par jour à la main jusqu'à obtenir un taux de matière sèche de 85% (Figure 31).

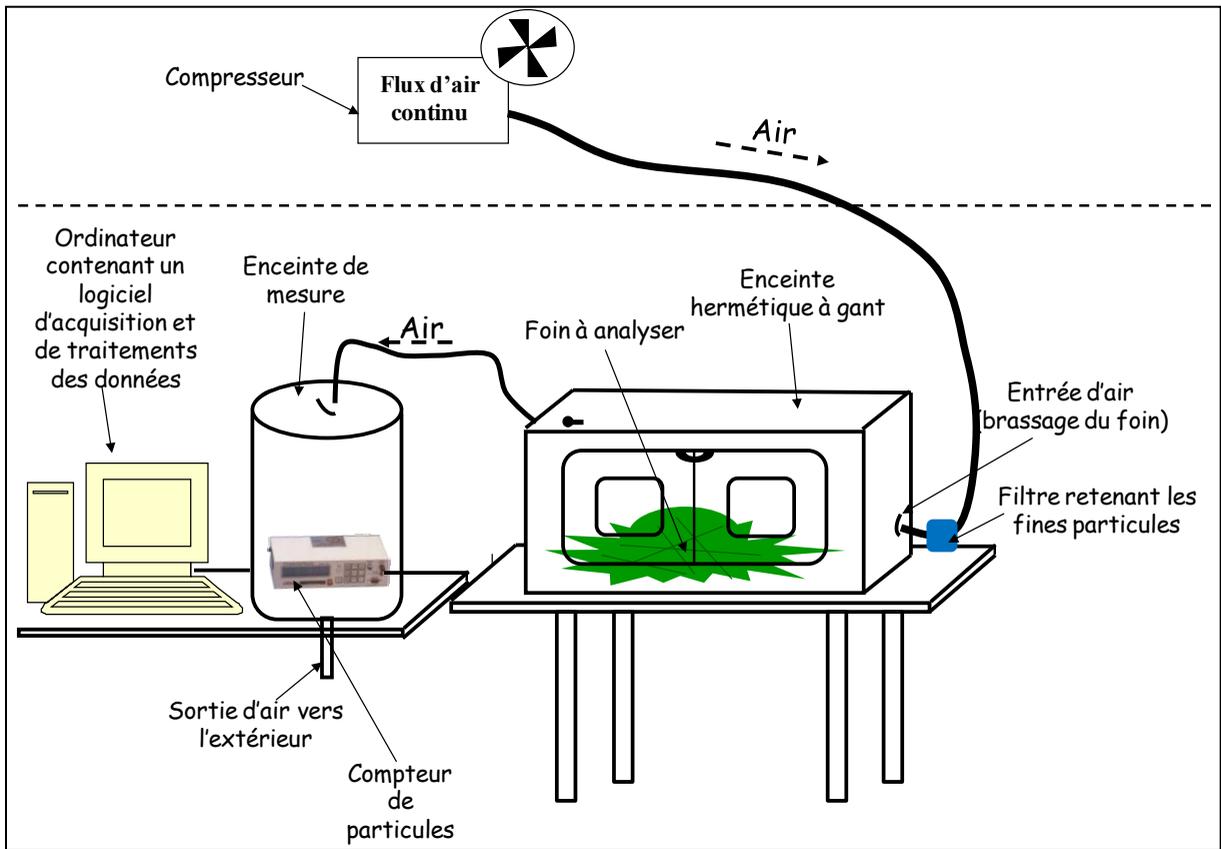


Figure 32 : Schéma du dispositif expérimental servant à quantifier les poussières.

II. Méthodes d'analyse

II.1 Evaluation de la qualité sanitaire

L'évaluation de la qualité sanitaire des foins a été réalisée par la quantification et la caractérisation des différents constituants de la poussière et notamment les poussières totales et respirables (diamètre $<5\mu\text{m}$), les moisissures, les mycotoxines, les endotoxines et les pollens. Deux modes d'extraction ont été utilisés : une extraction aérienne pour les poussières respirables les moisissures et les mycotoxines et une extraction liquide pour les endotoxines, les pollens et la matière minérale des poussières. La première année de thèse a principalement été consacrée à la mise au point de toutes ces méthodes nécessaires à l'évaluation de la qualité sanitaire des fourrages.

II.1.1 Quantification des poussières

II.1.1.1 Protocole expérimental

La méthode employée pour la quantification et la caractérisation des poussières totales et respirables est adaptée d'une méthode standardisée, mise au point par Vandenput *et al.* (1997).

Une enceinte à gants hermétique de 200 L est connectée à un compresseur permettant l'arrivée d'un flux d'air constant de 200 L/min. Afin d'éviter toute contamination par l'air extérieur lors de la mesure, un filtre à la sortie du compresseur, retenant l'eau et les huiles, a été mis en place et un second filtre en microfibres de verre protégé par une coque en polypropylène (600 cm², Whatman HEPA-CAPTM 36), avant l'entrée de l'air dans la couveuse, a également été installé afin de piéger les fines particules. L'enceinte est ensuite connectée à une deuxième enceinte hermétique (80 L) dans laquelle est disposé le compteur de particules aériennes (Grimm Model 1.108, GmbH & CoKG) dont le volume d'aspiration est de 1.2 L/min (Figure 32). Ce système permet, à l'aide d'une détection laser, de quantifier et de classer les particules par classes de taille : fraction respirable de 0.3 à 5 μm ; fraction alvéolaire de 5 à 10 μm et fraction inhalable pour les particules supérieures à 10 μm . L'avantage de ce système réside dans le fait que toutes les poussières aspirées par l'appareil sont automatiquement collectées sur un filtre en PTFE (45 mm de diamètre, pores de 0,2 μm) qui se trouve à l'arrière de l'appareil. Ce filtre servira par la suite aux analyses microbiologiques (comptage et identification des moisissures et quantification des mycotoxines). Lors d'une analyse, l'échantillon de foin est scellé dans un sac hermétique puis placé dans l'enceinte qui est fermée hermétiquement. Un flux d'air constant est pulsé dans l'enceinte afin d'évacuer toutes les poussières présentes initialement dans la couveuse. Une fois ce temps écoulé,

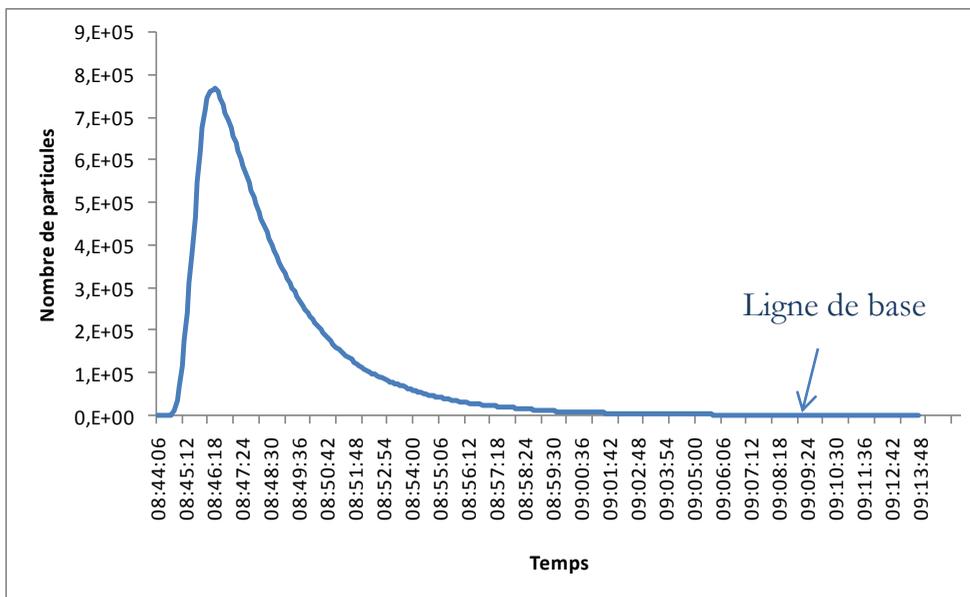


Figure 33 : Exemple de spectre issu de la quantification des poussières aériennes contenu dans du foin. Une mesure est réalisée toutes les 6 secondes et ceci durant 30 min pour des fourrages secs.

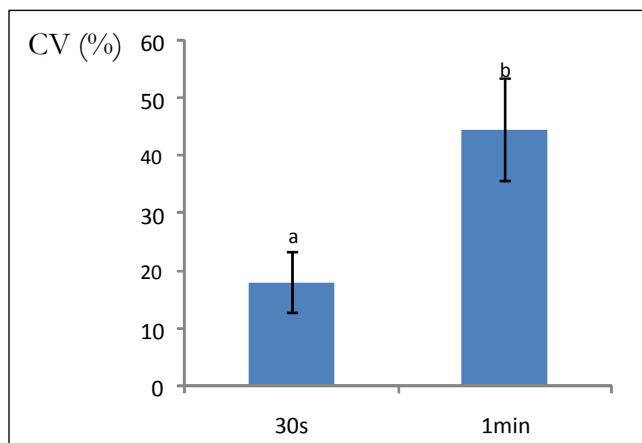


Figure 34 : Coefficients de variation du nombre de réplicats en fonction du temps de brassage. Des lettres différentes au dessus des barres verticales indiquent une différence significative à $p < 0.05$ ($n=5$, test de la médiane de Mood).

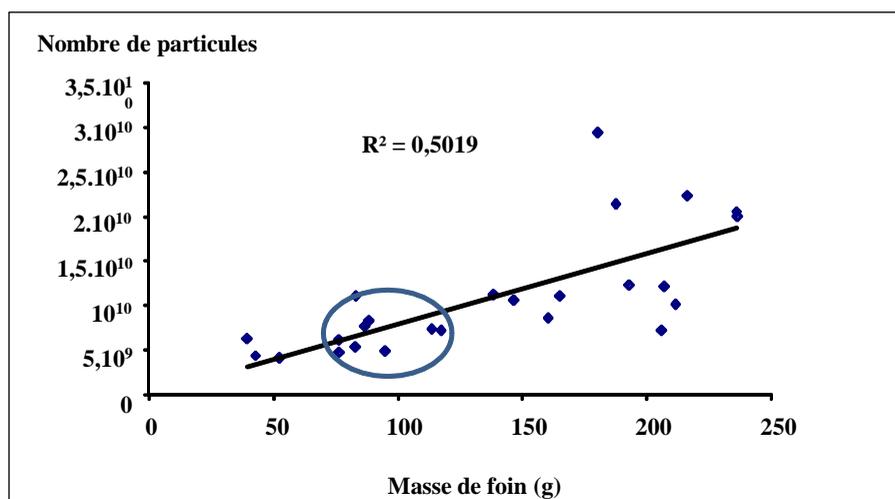


Figure 35 : Nombre de particules en fonction de la masse de foin (en g) à analyser.

l'échantillon de foin est brassé afin de maximiser la volatilisation des poussières. Le temps de brassage optimal a fait l'objet d'essais préliminaires.

La mesure dure jusqu'à ce que l'appareil revienne à sa ligne de base (Figure 33). Après la mesure, le filtre est conservé à +4 °C pour les comptages et identifications des souches fongiques ou à -20 °C pour les analyses de mycotoxines.

II.1.1.2 Essais préliminaires

La mise au point a consisté à déterminer le nombre d'échantillons à analyser pour une même botte, la masse de foin à analyser, le temps de brassage du foin et le temps de la mesure après le brassage. Ces différents points ont été optimisés afin de réduire au maximum la variabilité. Trois foins de qualité contrastée ont été utilisés pour l'élaboration du protocole : 2 foins Bas-Normand, l'un jugé de mauvaise qualité et l'autre de qualité moyenne et du foin de Crau destiné à l'alimentation pour rongeur. Le foin de Crau est un foin possédant une appellation d'Origine Contrôlée, réputé de bonne qualité, produit dans la plaine de Crau située entre Arles, Salon de Provence et Fos sur mer dans les Bouches du Rhône. Il présente une flore spécifique composée majoritairement de *Fabaceae* et de *Poaceae*.

Cette mise au point a, tout d'abord, permis de déterminer le temps de vidage de la couveuse ainsi que le temps de la mesure. Entre chaque échantillon, il faut 15 min pour que toutes les poussières provenant de l'extérieur soient évacuées et il faut 30 min pour que l'appareil reprenne sa ligne de base entre le brassage et la fin de la mesure (Figure 33).

Deux temps de brassage ont été testés : 30 s et 1 min. Après plusieurs analyses effectuées sur les trois foins, il s'est avéré que 30 s était le temps de brassage présentant la plus faible variabilité entre échantillon (Figure 34). Il était significativement plus faible que pour le brassage d'1 min.

L'analyse de plusieurs échantillons de masses différentes (de 39 g à 235 g) du foin de mauvaise qualité, a permis de constater que le coefficient de variation le plus faible était obtenu pour une masse de 100 g de foin (Figure 35).

Etant donné la forte hétérogénéité du contenu en poussières au sein d'une même botte, des essais ont été réalisés afin de déterminer un nombre minimum d'échantillons à analyser afin de minimiser le coefficient de variation. Evidemment, plus le nombre d'échantillons, est important et plus le coefficient de variation diminue. Etant donné le temps important consacré à l'analyse des poussières pour un seul échantillon et la forte hétérogénéité au sein d'une même botte, un compromis de 10 échantillons a paru suffisant pour obtenir une faible variabilité (coefficient de variation < 18%).

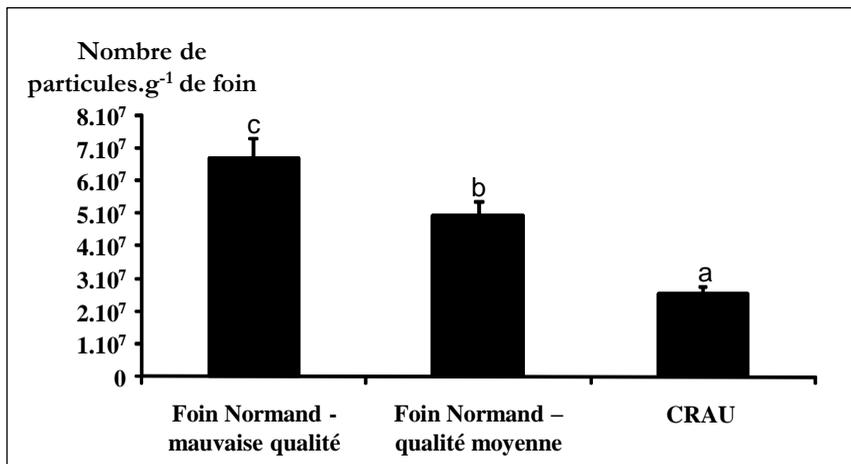


Figure 36 : Quantification des poussières totales contenues dans les foins utilisés lors de la mise au point du protocole. Des lettres différentes au dessus des barres verticales indiquent une différence significative à $p < 0.05$ ($n=10$, test de la médiane de Mood).

Les poussières aspirées à partir de l'analyse des 10 échantillons étaient récoltées sur deux filtres afin, d'une part, de quantifier et identifier les espèces fongiques, et, d'autre part, de quantifier les mycotoxines dans les poussières aériennes. Ainsi, afin d'avoir assez de matériel biologique, les poussières des 4 premiers échantillons étaient récoltées sur un filtre PTFE (PALL TF-200, 47 mm, 0.2 μm) pour le comptage et l'identification des souches fongiques et celles des 6 derniers échantillons étaient récoltées sur un autre filtre PTFE (Sartorius, type 118, 47 mm, 0.2 μm) pour les analyses des mycotoxines.

Des essais préliminaires ont mis en évidence une différence de quantité de poussières entre les foins de qualité contrastée (Figure 36). Le foin dit de « mauvaise qualité » avec $6.3 \cdot 10^7$ particules de poussières par gramme de foin, présentait une quantité de poussières nettement supérieure au foin dit de « qualité moyenne » ($4,9 \cdot 10^7$ particules de poussières/ g de foin) et au foin de Crau ($2,5 \cdot 10^7$ particules de poussières/ g de foin).

Enfin, il est important de souligner que la quantité de poussières ainsi mesurée pour un échantillon ne correspond pas à la quantité totale et définitive que celui-ci peut produire. En effet, cet échantillon, s'il est de nouveau brassé mécaniquement sera capable de dégager à nouveau une quantité équivalente de poussières. Il n'existe donc pas de phénomène d'épuisement, ce qui peut s'expliquer par le fait que les tissus végétaux produisent d'autant plus de poussières qu'ils sont endommagés mécaniquement. D'une certaine façon, cela illustre l'effet que le cheval peut exercer sur le fourrage, lors du processus de consommation.

II.1.2 Analyse de la microflore fongique des poussières aériennes

Les filtres issus de l'analyse des poussières sont utilisés pour extraire les spores fongiques en vue de leur culture et de leur identification. Ces analyses ont été réalisées au GRECAN.

II.1.2.1 Mise en culture

Le filtre PTFE ayant servi à récolter les poussières, après l'avoir préalablement coupé en 4, est mis en suspension dans 5 ml d'eau stérile additionnée de 0,05 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Etats-Unis). Après 30 min d'agitation à 426 rpm sur un agitateur orbital (Heidolph, Schwabach, Allemagne), 3 dilutions sont réalisées (10^{-1} ; 10^{-2} et 10^{-3}) à partir de la suspension mère. Lorsque les filtres étaient très contaminés en poussières, une dilution supplémentaire à $1/10^4$ ^{ème} était réalisée.

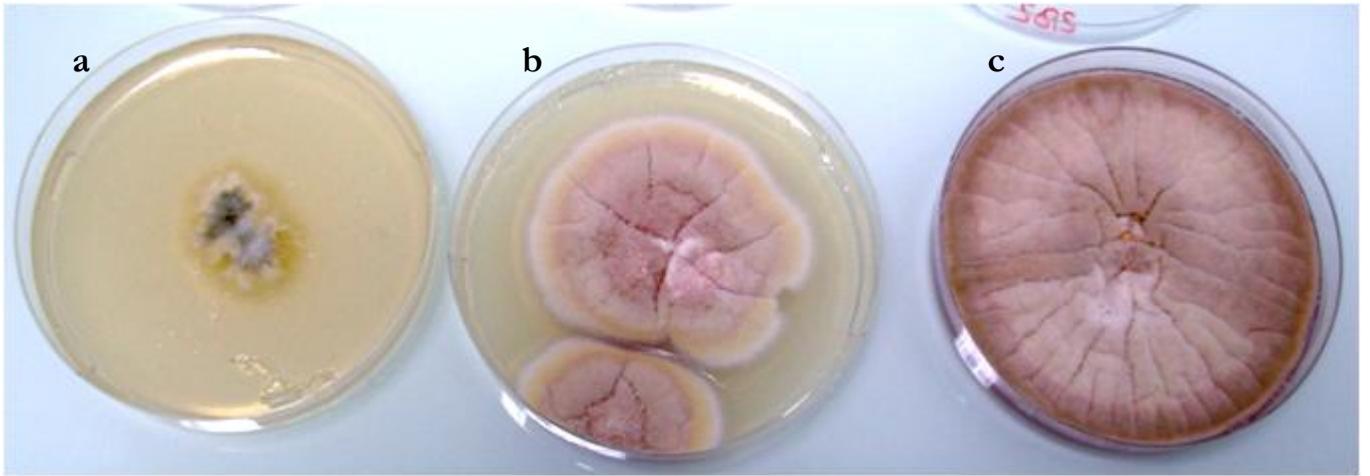


Figure 37 : Culture en boîte de Pétri d'*Aspergillus caespitosus* après 7 jours de culture sur milieux MEA à 25 °C (a), CYA à 25 °C (b) et CYA à 37 °C (c).

Un volume de 1ml de chaque dilution est versé dans un tube contenant 20 ml de milieu MEA constitué par du malt (1.5 %, w./v), de l'agar (1.5 %, w/v) et du chloramphénicol (0.05%, w/v). Ce milieu est maintenu en surfusion au bain marie. Le milieu MEA est un milieu usuel en microbiologie fongique car il permet la croissance d'un maximum d'espèces fongiques. Après homogénéisation au vortex, les tubes sont coulés en boîtes de Pétri, lesquelles sont mises à incuber à 25 ou 30°C pendant une semaine. Pour chaque dilution, des triplicats ont été réalisés et ceci pour les deux températures. Ainsi pour un filtre, 18 boîtes de comptage (3 dilutions*3 réplicats*2 températures) sont utilisées.

Un comptage est ensuite réalisé une fois par jour pendant 7 jours pour chaque boîte. A l'issue de ces comptages, la concentration en organismes fongiques, exprimée en Unité Formant Colonie par mètre cube d'air aspiré (UFC.m⁻³), a été déterminée.

A l'issue de ces 7 jours, l'identification des espèces fongiques est réalisée après isolement et purification.

II.1.2.2 Isolement et purification

Chaque colonie est identifiée après isolement et purification réalisés par des repiquages successifs sur milieu MEA.

Après purification sur MEA, chaque isolat est repiqué sur des milieux sélectifs selon le genre auquel il appartient. La composition de chacun des milieux utilisés pour la purification ainsi que pour l'identification des souches fongiques est présentée en Annexe I.

Les *Aspergilli* sont ensemencés sur un milieu CYA (Czapek Yeast autolysate Agar). Les espèces du genre *Eurotium*, apparentées aux *Aspergilli*, sont également repiquées sur un milieu riche en sucrose, le CYA20 (Czapek Yeast Agar avec 20% de sucrose). La Figure 37 présente *Aspergillus caespitosus* après 7 jours de culture sur MEA à 25 °C, CYA à 25 °C et CYA à 37 °C.

Les espèces du genre *Penicillium* sont, à la fois, ensemencées sur milieu CYA et milieu G25N (25% Glycerol Nitrate Agar).

Les *Aspergilli* et *Penicillia*, une fois repiqués, sont incubés à 5, 25 et 37°C.

Les *Fusaria* ont, quant à eux, été repiqués sur MEA et sur PDA (Potato Dextrose Agar medium), milieu à base de pomme de terre favorisant ainsi la sporulation (Booth, 1966).

II.1.2.3 Identification des espèces fongiques

Après 7 jours d'incubation, chaque souche fongique est identifiée par observation macro- et microscopique selon des critères morphologiques (Pitt, 1979; Domsch *et al.*, 1980 ; Von Arx, 1981 ; Klich, 2002 ; Samson *et al.*, 2002 ; Samson *et al.*, 2004).

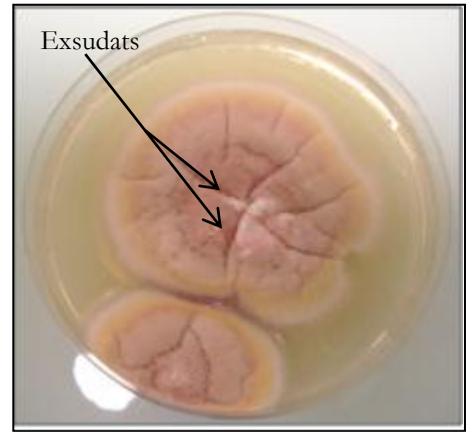
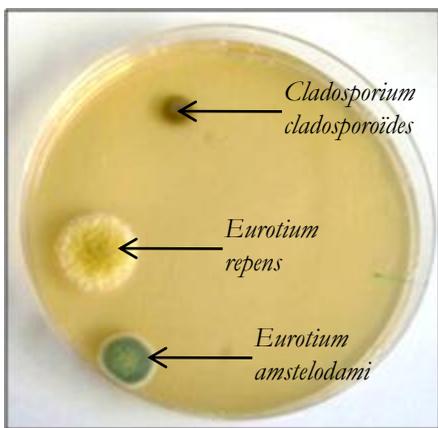


Figure 38 : La couleur des colonies diffère d'une espèce à l'autre.

Figure 39 : Après 7 jours de culture, *Penicillium piceum* (à gauche) présente un diamètre de colonie plus élevé qu'*Eurotium repens* (à droite).

Figure 40 : Après 7 jours de culture, des exsudats de couleur rose apparaissent sur l'espèce *Aspergillus caespitosus*.

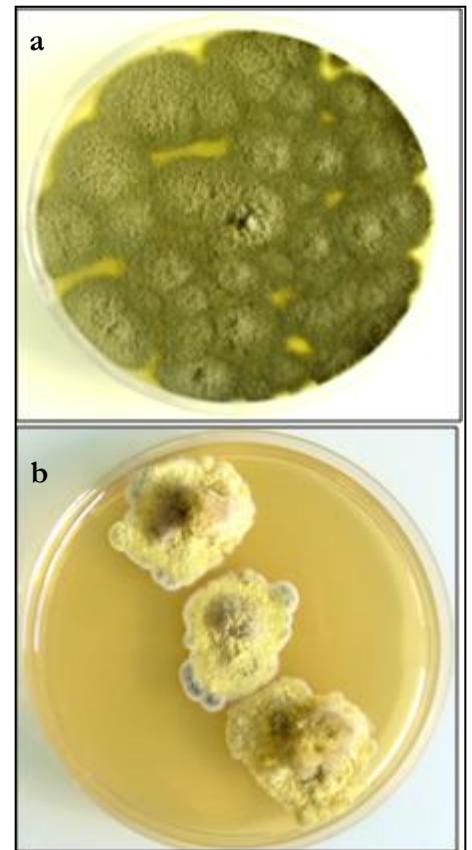
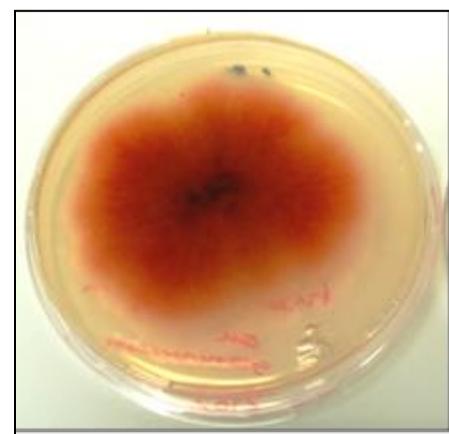


Figure 41 : *Monascus ruber* se caractérise par un pigment soluble de couleur rouge qui diffuse dans la gélose.

Figure 42 : *Fusarium culmorum* présente un revers rose-orangé sur milieu MEA.

Figure 43 : *Aspergillus fumigatus* (en haut) présente une texture poudreuse avec peu de relief alors qu'*Eurotium amstelodami* (en bas) présente une texture veloutée velue avec du relief sur milieu MEA.

a. Identification macroscopique

L'identification macroscopique se fonde sur plusieurs critères :

➤ La couleur de la colonie

La couleur de la colonie est due à la couleur des conidies mais également du mycélium. Cette caractéristique est l'une des plus importantes à ce niveau de l'identification. La couleur varie d'un genre à l'autre mais également d'une espèce à l'autre (Figure 38).

➤ Le diamètre de la colonie

Le diamètre des colonies dépend du genre fongique considéré. L'espèce *Trichoderma viridae*, par exemple, se développe rapidement sur un milieu MEA à l'inverse de l'espèce *Eurotium repens* qui présente des colonies de petite taille. Le diamètre des *Aspergilli* et *Penicillia*, doit être mesuré à 7 jours de pousse sur les différents milieux sélectifs utilisés pour l'identification (Figure 39).

➤ La présence d'exsudats

Certaines espèces fongiques présentent un exsudat à la surface de leur mycélium. Ces exsudats sont en forme de gouttelettes. Ils peuvent être aqueux ou muqueux et de couleur variable (figure 40).

➤ La présence d'un pigment soluble

Un pigment soluble et diffusif dans le milieu peut apparaître chez certaines espèces. Ce pigment forme alors une auréole colorée autour de la colonie (figure 41).

➤ La couleur du revers

La couleur du revers est la couleur observée au dos de la colonie, à travers la gélose. La couleur est dépendante du milieu (Figure 42).

➤ La texture et le relief de la colonie

Selon l'espèce fongique, la texture et le relief de la colonie sont différents. Certaines sont poudreuses, lévuriformes, filamenteuses, veloutées ou encore laineuses (Figure 43).

➤ L'odeur

Certaines espèces de moisissures ont une odeur caractéristique telle que *Penicillium expansum* qui dégage naturellement une odeur de pomme.

b. Identification microscopique

L'identification microscopique se fonde, sur l'observation des structures végétatives telles que les conidies et les conidiophores et parfois des structures sexuées (zygospore, cléistothèces). Cette observation s'effectue après montage entre lame et lamelle d'un petit échantillon de mycélium et de conidies. Le grossissement approprié pour identifier les structures caractéristiques

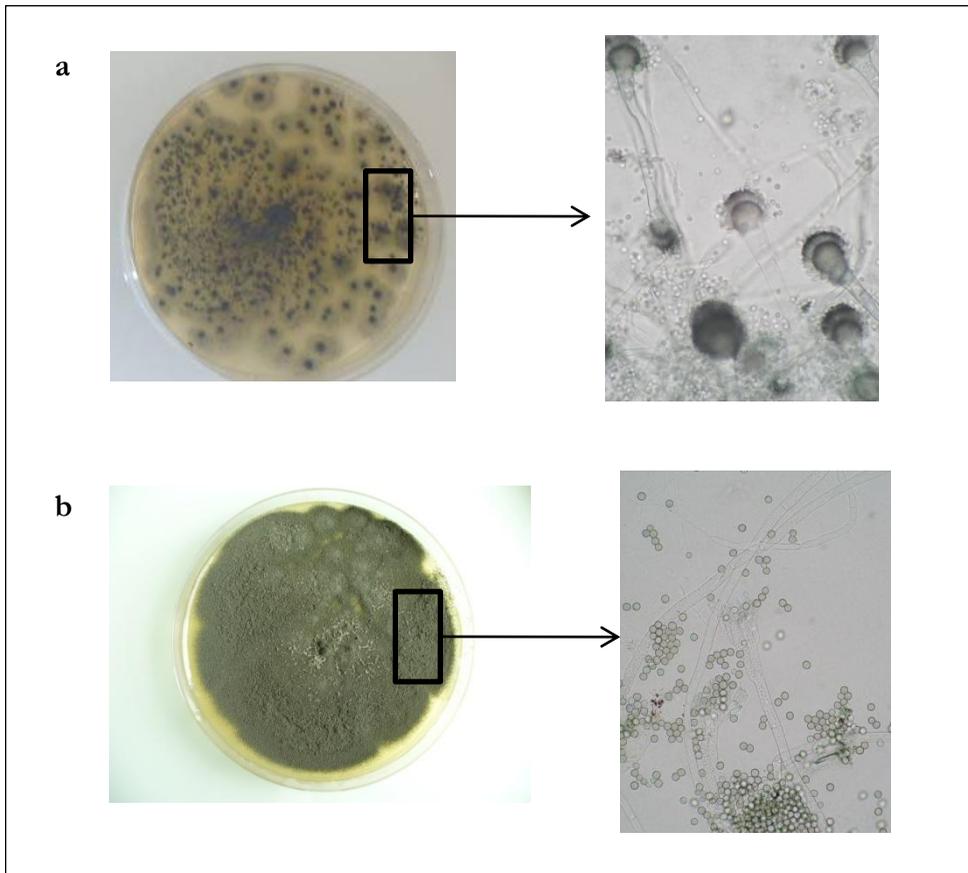


Figure 44 : Exemple de conidiophores d'*Aspergillus fumigatus* (a) et de *Penicillium roqueforti* (b) par observation microscopique (x 1000).

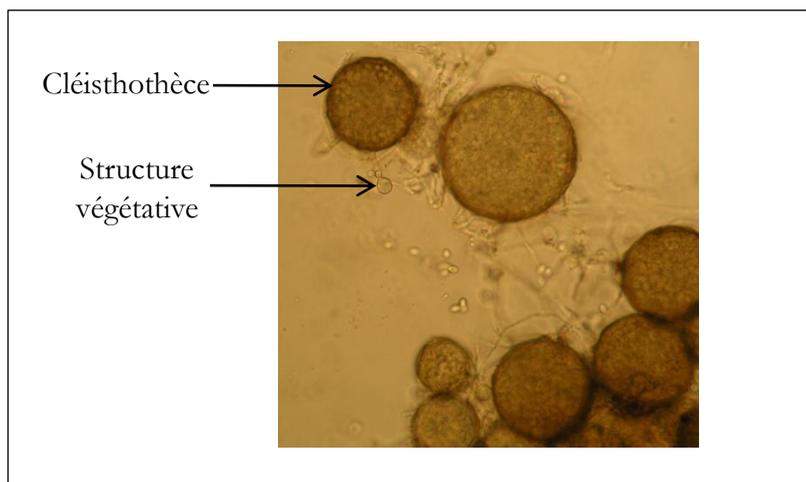


Figure 45 : Exemple de cléistothèques, structures sexuées de l'espèce *Monascus ruber* accompagnées de structures végétatives par observation microscopique (x 1000).

est de 400. Le passage à l'immersion (x 1000) permet d'affiner l'identification et ainsi d'observer plus en détail ces structures

Lors de l'observation microscopique, différentes parties de l'organisme fongique sont étudiées.

➤ Le thalle

Le thalle qui est l'appareil végétatif des champignons est différent selon les moisissures. Chez les *Zygomycota*, le thalle est siphonné alors que chez les *Ascomycota*, le thalle est cloisonné.

➤ Les conidies

L'observation des conidies est un des critères importants pour l'identification microscopique. La taille, la couleur, l'ornementation (échinulée, lisse, rugueuse) et la forme, sont autant de critères d'identification possible pour les organismes fongiques.

➤ Les cellules conidiogènes

Le mode de regroupement (solitaire, groupées en tête) des cellules conidiogènes comme les phialides et le mode de production des conidies permettent également la détermination d'espèces fongiques.

➤ Le conidiophore

L'observation du conidiophore est également un critère d'identification. Les conidiophores sont des filaments qui portent les cellules conidiogènes et sont différents d'un genre à l'autre (Figure 44).

➤ Présence de structures caractéristiques

La présence de ces structures peut être déterminante pour l'identification d'une espèce. Elles peuvent être, par exemple, des structures sexuées telles que les cléistothèces (Figure 45). Parfois, pour la confirmation d'espèces potentiellement toxigènes, des méthodes de PCR ont été utilisées (Richard *et al*, 2009).

La liste des espèces fongiques identifiées dans les poussières des foins analysés au cours de ces travaux de recherche est présentée en Annexe 2.

II.1.3 Quantification des mycotoxines

La quantification des mycotoxines a été réalisée au Laboratoire Départemental Frank Duncombe (LDFD14), à l'aide d'une Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un Spectromètre de Masse (CLHP-SM). Dix huit mycotoxines sont recherchés (aflatoxine B₁, aflatoxine B₂, aflatoxine G₁, aflatoxine G₂, aflatoxine M₁, alternariol, citrinine, diacetyoxyscirpenol, deoxinivalénole, fumagilline, fumonisine B₁, fumonisine B₂, gliotoxine, nivalénol, ochratoxine A,

T-2 toxine, verruculogène, zéaralénone) d'une part, dans la matrice végétale et, d'autre part, dans les filtres PTFE issus des comptages de poussières. Ces méthodes ont été développées à partir des travaux effectués sur d'autres matrices végétales telles que les ensilages ou les tourteaux d'oléagineux (Garon *et al.*, 2006 ; Lanier *et al.*, 2009).

II.1.3.1 Extraction dans la matrice foin

La quantification des mycotoxines à partir de la matrice végétale nécessite 3 étapes : une étape d'extraction, une étape de purification et une étape de dosage.

a. Extraction

Pour chaque botte de foin, 100 g de foin sont prélevés au hasard puis broyés (broyeur à fléau de type SK1, Retsch, pore à 3 mm) afin d'homogénéiser l'échantillon. Un aliquot de 5 g est ensuite pesé dans un pot de 100mL DURAN. Les mycotoxines sont extraites avec 100 mL d'un mélange méthanol/eau (80/20, v/v) puis l'échantillon est broyé en utilisant un Ultra-Turrax basic T25 homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany). Après avoir recouvert les pots de papier d'aluminium, ils sont agités pendant 60 min à 100 rpm à l'aide d'un agitateur rotatif. A l'issue de cette agitation, le contenu des pots est transféré dans un tube à centrifuger de 170 mL. Les pots sont rincés avec 50 mL de méthanol/eau (80/20, v/v) qui sont également transférés dans les tubes à centrifuger. Les tubes à centrifuger sont équilibrés et centrifugés à 7000 rpm pendant 15 min à 10 °C. Puis, 100 mL du surnageant sont transférés dans des flacons en verre à usage unique puis conservés à 4 °C jusqu'à la purification.

b. Purification

Un volume de 15 mL du surnageant est dilué dans 90mL d'eau ultra pure (EUP), acidifié avec 400 µL d'Acide acétique glacial et ensuite purifié sur colonnes Oasis HLB (6 mL, 200 mg) (Waters, Milford, MA, USA), préalablement conditionnées avec 5 mL de méthanol et 5 mL d'EUP. Une fois l'échantillon passé, les colonnes sont rincées avec 2 mL d'EUP.

Les mycotoxines sont éluées avec 5 mL de méthanol suivis de 10 mL de méthylterbutyle ether (MTBE)/méthanol (90/10, v/v). Les mycotoxines éluées sont évaporées tout d'abord, à l'aide d'un évaporateur Büchi Syncore Line 15-2644 relié à une pompe à vide et un refroidisseur (Syncore polyvap, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), à 40 °C, à 400 tr/min et à une pression de 250 mbar pendant 30 min, puis à 200 mbar pendant 30 min et enfin à 150 mbar pendant 45 min. Avant d'arriver à sec, les extraits sont transférés dans des tubes de 15 mL en

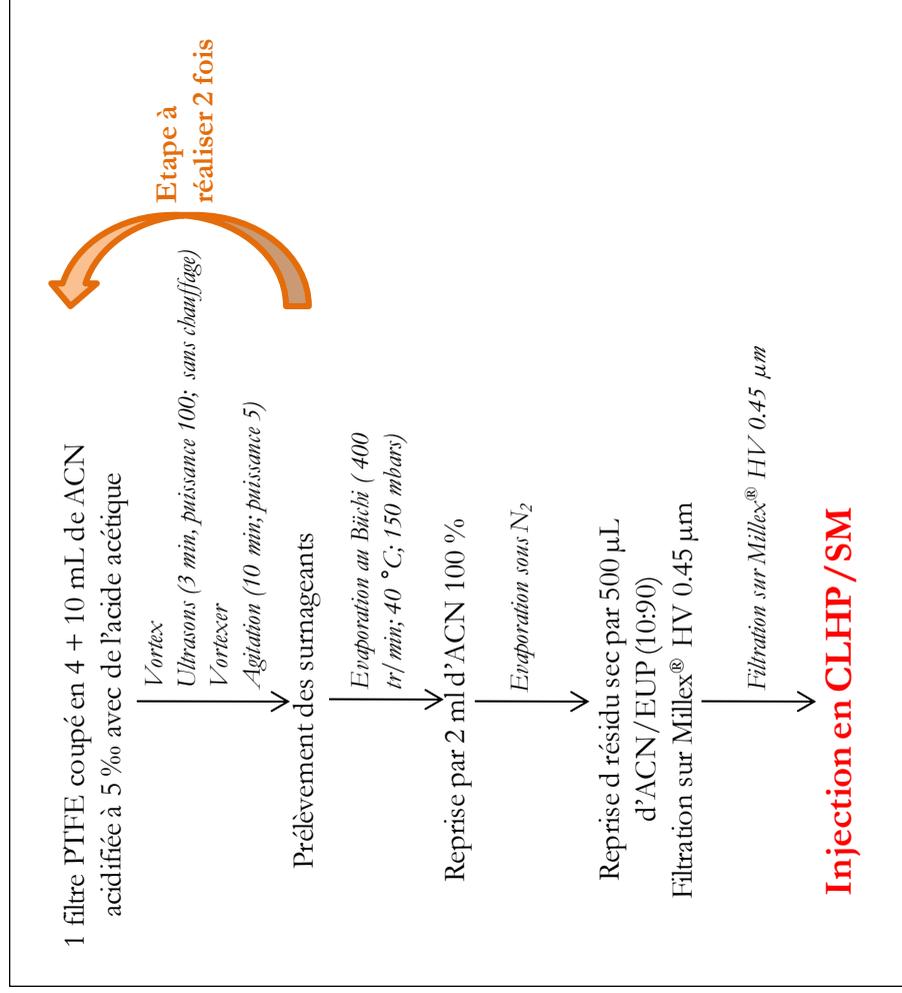


Figure 47 : Protocole de dosage des mycotoxines dans les poussières aériennes des foins à partir de filtres PTFE.

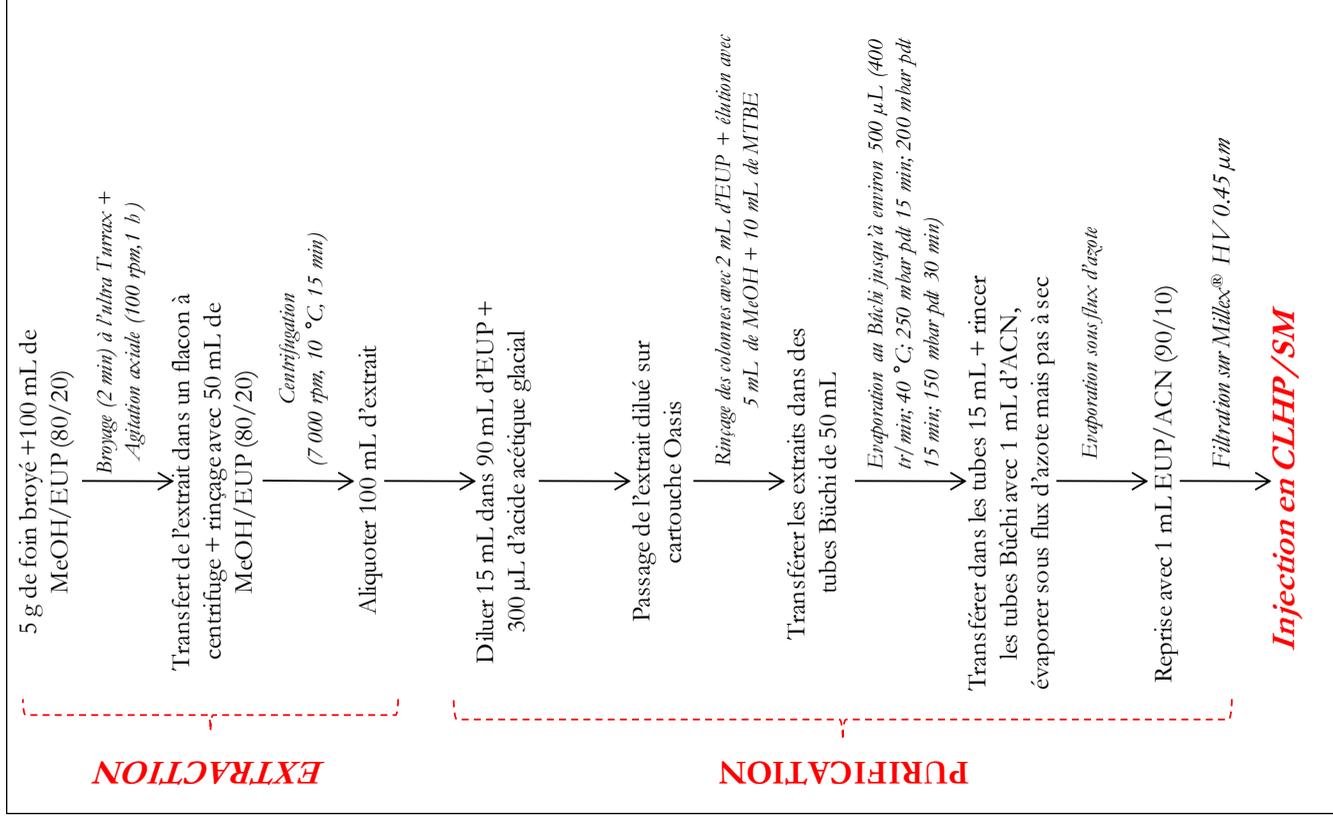


Figure 46 : Protocole de dosage des mycotoxines dans la matrice foin.

rinçant le tube Büchi de 50 ml avec 1 mL d'acétonitrile (ACN). L'évaporation est ensuite finalisée sous un courant d'azote.

Le résidu sec est dissout dans 1 mL d'un mélange d'ACN/EUP (10/90, v/v), filtré sur membrane PVDF de porosité 0.45 μm (Millex HV) avec une aiguille et seringue à usage unique puis transféré dans un pilulier conique.

Les piluliers sont conservés à -20 °C jusqu'à leur passage en CLHP-SM.

Le protocole d'extraction et de purification est résumé dans la figure 46

II.1.3.2 Dans les poussières aériennes

Les filtres issus de la quantification des poussières de 6 des 10 échantillons de foin analysés sont découpés en 4 et conservés dans un tube Falcon de 15 mL à -20 °C jusqu'à leurs analyses.

Lors de l'analyse, 10 mL d'ACN acidifié par de l'acide acétique (0.5 %) sont ajoutés dans le tube Falcon, vortexés, puis passés aux ultrasons pendant 3 min à puissance 100, sans chauffage et vortexés de nouveau. Après agitation pendant 10 min à puissance 5, sur un plateau d'agitation (VWR VX-2500 Multi-tube Vortexer), le surnageant est prélevé et conservé dans un tube Büchi de 50 ml. Puis la manipulation est répétée une seconde fois en rassemblant le surnageant avec le premier. La totalité du surnageant est ensuite mis à évaporer sous Büchi (400 rpm ; 40 °C ; 150 bars). Avant la fin de l'évaporation à sec, le résidu est repris par 2 ml d'ACN pur puis évaporé sous azote. Le résidu sec est ensuite repris avec 500 μL d'ACN/EUP (10/90) puis filtré sur membrane PVDF de porosité 0.45 μm (Millex HV) avec une aiguille et seringue à usage unique, puis transféré dans un pilulier conique avant injection en CLHP-MS. Les piluliers sont également conservés à -20 °C jusqu'à leur passage en CLHP-MS.

Le protocole d'extraction et de purification est résumé dans la figure 47.

II.1.3.3 Analyse par Chromatographie Liquide Haute performance couplée à un Spectromètre de Masse (CLHP-SM)

L'appareil utilisé pour réaliser les analyses des mycotoxines est un appareil de Chromatographie Liquide Agilent Technologies série 1100 (Agilent, Palo Alto, Etats-Unies). Ce système est composé d'une colonne analytique Zorbax SB-C18 (5 μm , 150 mm * 2.1 mm) équipée d'une pré-colonne Securityguard cartridge C18 (4 x 2 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), d'un injecteur automatique, d'une pompe quaternaire couplée à un dégazeur à membrane, d'un four pour la colonne, garantissant une température constante de 40 °C, d'un détecteur à barrettes diodes (DAD), d'une station de pilotage et d'un système de traitement des données.

Tableau XIV : Paramètres utilisés pour l'analyse des mycotoxines par CLHP-MS.

Paramètres	
Température	350 °C
Gaz de séchage	12 L/min
Pression de nébulisation	35 psig
Vcap positif	3 000 V
Vcap négatif	3 000 V
Fragmenteur	150

Tableau XV : Paramètres utilisés pour la quantification des mycotoxines dans le foin par CLHP-SM.

Mycotoxines	Temps de rétention (min)	Ions de contrôle (m/z)	Ion de quantification (m/z)	rendement (%)	Limite de quantification (mg/kg)
Aflatoxine B ₁	14.6	335 (+) 647 (+)	313 (+)	97	0.1
Aflatoxine B ₂	12.9	316 (+) 651 (+)	315 (+)	91	0.1
Aflatoxine G ₁	12.6	330 (+) 351 (+)	329 (+)	90	0.1
Aflatoxine G ₂	11.1	332 (+) 683 (+)	331 (+)	100	0.1
Aflatoxine M ₁	10.1	351 (+) 679 (+)	329 (+)	97	0.1
Alternariol	16.1	258 (-) 259 (+)	257 (-)	89	0.1
Citrinine	16.5	233 (+) 273 (+)	251 (+)	42	0.15
Diacetoxyscirpenol	13.7	307 (+) 349 (+)	389 (+)	80	0.15
Fumagilline	25.8	458 (-) 539 (-)	457 (-)	44	0.1
Fumonisine B ₁	17.6	723 (+) 724 (+)	722 (+)	96	0.05
Fumonisine B ₂	21.0	707 (+) 708 (+)	706 (+)	78	0.05
Gliotoxine	12.1	245 (+) 227 (+)	263 (+)	76	0.1
Ochratoxine A	23.1	405 (+) 406 (+)	404 (+)	58	0.1
T-2 toxine	21.8	484 (+) 305 (+)	489 (+)	32	0.2
Verruculogène	24.6	495 (+) 410 (+)	494 (+)	62	0.1
Zéaralénone	22.9	318 (-) 319 (+)	317 (+)	45	0.1

Lors du dosage, le débit est de 0.4 mL/min, le volume d'injection est de 10 µL et la durée de l'analyse est de 30min.

Ce système est couplé à un spectromètre de masse CPL/MDS Agilent série 1100 composé d'une chambre de nébulisation, où l'ionisation à pression atmosphérique est de type électrospray (API-ES), d'un filtre de masse quadripolaire et d'un détecteur à dynode haute énergie (HED). Le système d'ionisation API-ES est un procédé utilisant un champ électrique pour générer des gouttelettes chargées, puis des ions analytes par évaporation en vue de leur analyse par un spectromètre de masse. Les paramètres utilisés pour le spectromètre de masse sont présentés dans le tableau XIV.

Les mycotoxines sont séparées en utilisant un gradient d'élution avec de l'ACN (solvant A) et de l'EUP acidifiée avec 0.5% d'acide acétique (pH 3) (solvant B). Le gradient de phase mobile ACN/EUP acidifiée par l'acide acétique (0.5 %) est le suivant :

- $T_{0\text{min}}$: ACN/EUP acidifiée (5/95)
- $T_{3\text{min}}$: ACN/EUP acidifiée (20/80)
- $T_{14\text{min}}$: ACN/EUP acidifiée (30/70)
- $T_{20\text{min}}$: ACN/EUP acidifiée (50/50)
- $T_{27\text{min}}$: ACN/EUP acidifiée (70/30)

Le Tableau XV présente les paramètres d'analyse et les limites de quantification des mycotoxines recherchées en CLHP-SM.

II.1.4 Extraction liquide des poussières

Une extraction liquide des poussières a été réalisée afin de (i) déterminer la concentration et identifier les pollens (ii) définir la concentration en endotoxines et (iii) déterminer le contenu en matière minérale des poussières afin d'estimer la contamination par le sol des fourrages. Pour chaque botte de foin analysée, un aliquot de 100 g est prélevé puis agité dans 1.5 L d'eau osmosée pendant 30 min. A l'issue de cette agitation, seul le liquide d'extraction est conservé (Figure 48).

II.1.4.1 Quantification et identification des pollens

La quantification des pollens dans les foins permet de comparer les pratiques culturales et d'identifier d'éventuels traitements permettant de réduire leur présence. La production de foin se déroulant sur une même prairie, la composition floristique des pollens au sein des foins produits expérimentalement ne devrait pas varier en fonction des traitements mais peut être en fonction des périodes de récolte.

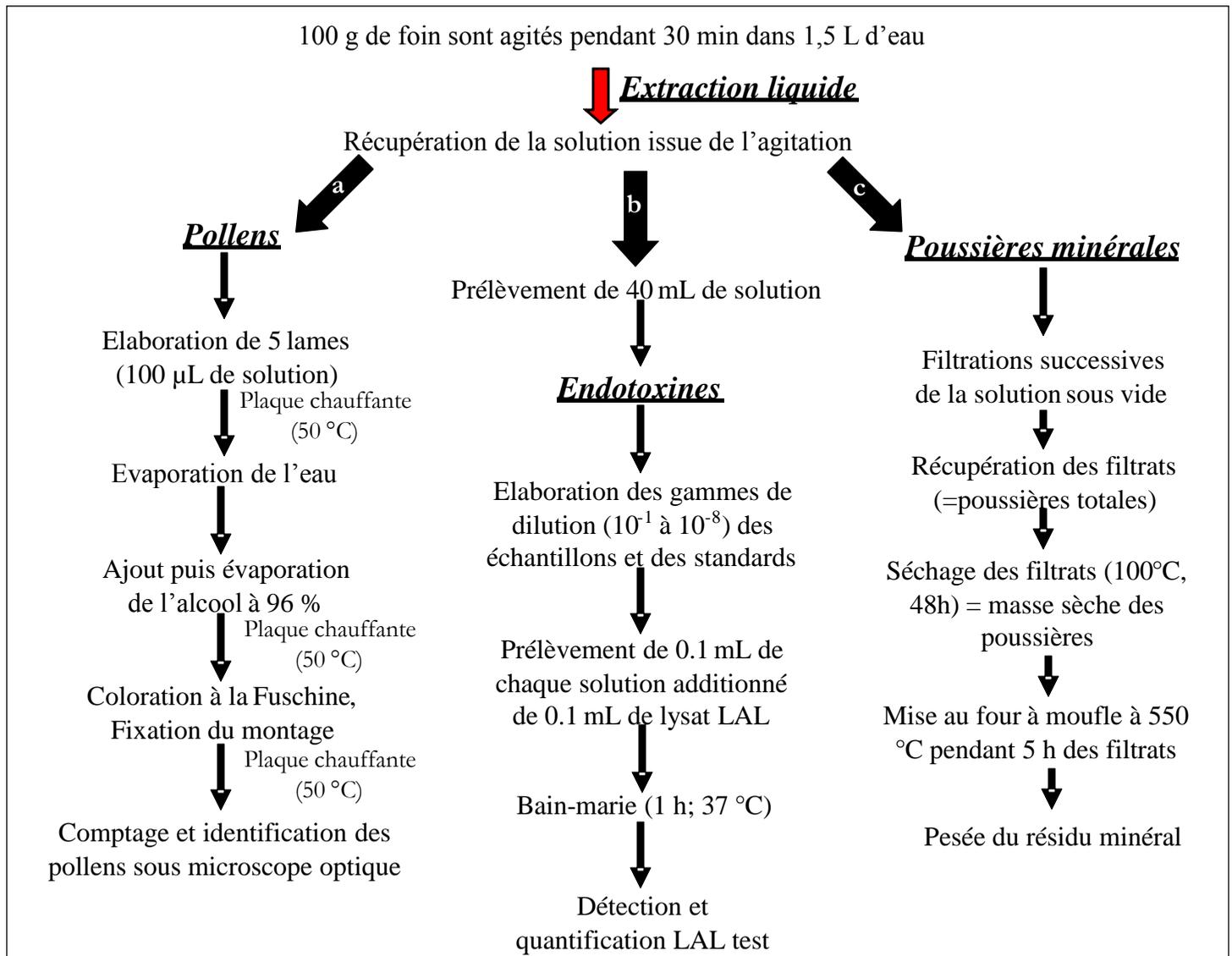


Figure 48 : Protocole d'extraction liquide afin de quantifier les pollens, les endotoxines ainsi que la matière minérale contenus dans les poussières aériennes des foins.

Pour chaque foin analysé, 5 réplicats de 100 μ L de la solution d'extraction précédente sont analysés après montage entre lame et lamelle selon la méthode de Wodehouse avec un colorant contenant de la Fuschine (Wodehouse, 1971).

Cette méthode comporte plusieurs étapes. Une fois les 100 μ L déposés sur les 5 lames, l'eau est évaporée en plaçant la lame sur une plaque histologique chauffante (50 °C environ). Puis une goutte d'alcool à 96 °C est ajoutée sur les lames et évaporée comme précédemment. L'alcool permet d'éliminer l'enveloppe de protection des pollens et ainsi d'observer les ornements. Les lames sont retirées de la plaque chauffante puis 2 à 3 gouttes de colorant sont ajoutées. Après disposition de la lamelle, les lames sont replacées sur la plaque chauffante quelques secondes afin de fixer le montage.

Les lames sont ensuite examinées sous un microscope inversé Nikon DIAPHOT-TMD (Nippon Kogaku K.K., Tokyo, Japan). Les pollens sont tout d'abord observés et quantifiés avec un grossissement de 100. La quantification des pollens est effectuée selon un protocole adapté de celui du Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA). Considérant que les pollens sont répartis de façon homogène tout au long des lamelles, un quadrillage des lamelles a été réalisé afin de ne compter qu'une largeur sur deux de la lamelle. La concentration en pollen est ensuite exprimée en nombre de pollens par gramme de foin. Un résumé du protocole est présenté au travers de la figure 48a

Les pollens sont identifiés avec l'objectif x 400 voire à l'immersion (x 1000) afin d'observer les ornements. L'identification des pollens a été réalisée à la suite d'un stage de formation à la palynologie organisé par le Réseau National Supérieur d'Aérobiologie en janvier 2007.

Les critères permettant l'identification sont :

➤ La polarité

La polarité du grain de pollen est un critère de détermination. Un grain de pollen peut être apolaire, isopolaire (les pôles sont égaux), hétéropolaire (les pôles sont dissemblables) ou équateur (le contour horizontal du grain de pollen se situe à distance égale entre les deux pôles).

➤ La forme

Les grains de pollen peuvent être oblates avec un axe polaire plus court que le diamètre, équatoriaux, sphériques ou prolates avec un axe polaire plus long que le diamètre équatorial ou encore ovoïde.

➤ Les apertures

Le critère le plus important dans la détermination est la présence d'ouvertures dans les couches internes et externes de l'exine, appelées apertures. Deux formes d'apertures existent : les

Pollen monoporé

Poaceae
(*Lolium perenne*)



Pore

Pollen fenestré

Asteraceae liguliflore
(*Taraxacum officinale*)



Pollen tricolporé

Apiaceae
(*Daucus carota*)



Pore + sillon

Figure 49 : Exemple de grains de pollens de trois espèces prairiales.

pores (ouvertures arrondies) et les colpi (ouvertures allongées). Les grains de pollens peuvent être porés, colpés mais également colporés c'est-à-dire ayant une ou plusieurs doubles ouvertures (colpi et pores). La variabilité du nombre d'ouvertures chez un grain de pollen est également un critère important pour la détermination. Le nombre peut varier de 1 à 6 voire plus d'ouvertures. Certains sont même inaperturés c'est-à-dire sans ouverture comme les pollens de la famille des *Cupressaceae* ou du peuplier (*Populus spp.*).

➤ La surface

L'ornementation de l'exine permet également d'affiner l'identification. Les grains de pollens peuvent présenter une surface striée, rugulée (structure onduleuse), réticulée (réseau), échinulée (épine) comme le pollen des *Astéraceae* tubuliflores, ou encore lumina (ouvertures dans le réticule).

➤ Structures diverses

D'autres critères peuvent être utilisés comme la présence d'un opercule au niveau d'un pore, l'épaississement de l'intine sous les ouvertures appelé oncus ou encore la présence de protusion en forme de dôme autour de l'ouverture appelé aspis. Certains peuvent être sous forme de tétrades comme les *Ericaceae* ou en vésicules comme les pollens des Gymnospermes.

Tous ces éléments nous permettent d'identifier les pollens. Cependant pour la plupart des pollens, l'identification s'arrête à la famille, seuls quelques pollens peuvent être identifiés jusqu'au genre comme pour le Pin voire jusqu'à l'espèce comme pour l'Ambroisie. Des exemples de pollens accompagnés du genre végétal associé sont présentés au travers de la Figure 49.

II.1.4.2 Extraction et quantification des endotoxines

La concentration en endotoxines a été évaluée par une méthode semi-quantitative de 'gel-clot LAL' (*Limulus Amebocyte Lysate*) fondée sur la propriété que le lysat LAL coagule en présence d'endotoxines (Levin & Bang, 1968)(Figure 48b).

Chaque solution d'extraction liquide des poussières a été analysée en effectuant une gamme de dilution allant de 10^{-1} à 10^{-8} . Pour chaque dilution, 0.1 mL est ensuite additionné à 0.1 mL de Lysat LAL (Endosafe[®] LAL reagent; U.S. Licence No. 1197, Charles Rivers Laboratories).

Après une incubation de $1\text{h} \pm 2\text{ min}$ à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, les tubes sont retournés, un à un, d'un seul mouvement à 180° sans à coups. S'il s'est formé un gel solide qui reste en place, le résultat est positif. Dans le cas contraire, le résultat est négatif. Pour valider chaque test, un témoin positif (solution standard d'endotoxines à 0.25 UI/mL), un témoin négatif (eau apyrogène) ainsi que des

Tableau XVI : Pourcentage de matière minérale contenue dans différentes Poaceae et dans différents sols.

	% moyen de la Masse minérale
<i>Lolium perenne</i>	6,30
<i>Alopecurus geniculatus</i>	6,13
<i>Poa trivialis</i>	6,65
<i>Holcus lanatus</i>	6,10
Sol du Pin-au-Haras	92,56
Sol de Nonant le Pin	91,68

échantillons de solution mère dopée à 0.5 UI/mL d'endotoxines sont également analysés. L'essai est validé si le témoin négatif est négatif, si le témoin positif est positif et si les échantillons contaminés sont positifs.

La concentration en endotoxines a été estimée en multipliant la sensibilité du lysat LAL (0.125 UI/ mL pour cette étude) par le facteur de dilution. La méthode étant semi-quantitative, les résultats sont présentés entre 2 intervalles de concentrations. Ces intervalles, sont les suivants :

- $R \leq 1.875 \cdot 10^1 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin ;
- $1.875 \cdot 10^1 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin < $R \leq 1.875 \cdot 10^2 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin ;
- $1.875 \cdot 10^2 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin < $R \leq 1.875 \cdot 10^3 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin ;
- $1.875 \cdot 10^3 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin < $R \leq 1.875 \cdot 10^4 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin ;
- $1.875 \cdot 10^4 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin < $R \leq 1.875 \cdot 10^5 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin ;
- $1.875 \cdot 10^5 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin < $R \leq 1.875 \cdot 10^6 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin ;
- $1.875 \cdot 10^6 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin < $R \leq 1.875 \cdot 10^7 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin ;
- $1.875 \cdot 10^7 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin < $R \leq 1.875 \cdot 10^8 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin ;
- $1.875 \cdot 10^8 \text{ UI.g}^{-1}$ de foin > R .

II.1.4.3 Evaluation la contamination des poussières de foin par le sol via le contenu en matières minérales

Afin de mesurer la masse minérale des poussières pour évaluer leur contamination par le sol, un litre de la solution d'extraction des poussières a été filtré sur des filtres sans cendre de 90 mm de diamètre (DM Labo, ref 0011A00005, 90 mm) en utilisant une fiole à vide et un Büchner. Selon le niveau de poussières extraites dans les foins, 1 ou 2 filtres étaient utilisés suivant la saturation possible du premier. Ces filtres sont séchés à 100°C jusqu'à une masse constante dans une étuve puis incinérés à 550°C pendant 5 h dans un four à moufle afin de déterminer la masse résiduelle minérale des poussières (Norme AFNOR, ISO 5984, 2002) (Figure 48c).

Les pourcentages de matière minérale d'un végétal ou du sol ont été, respectivement, estimés après incinération de plusieurs échantillons de *Poaceae* présentes dans la prairie et de sol du Pin-au-Haras et de Nonant-Le-Pin qui se situe juste à proximité. En considérant que le contenu en matière minérale d'un végétal est proche de 6% et du sol proche de 90% (Tableau XVI), la contamination des poussières par le sol peut être estimée selon l'expression suivante :

$$\% \text{ contamination par le sol} = [(\% \text{ cendres} - 6) \cdot 100] / (90 - 6)$$

où

% cendres = pourcentage de matière minérale obtenu après la combustion.



Figure 50 : Protocole de dosage de la cellulose brute selon la méthode de Weende (Norme AFNOR, EN ISO 6865).

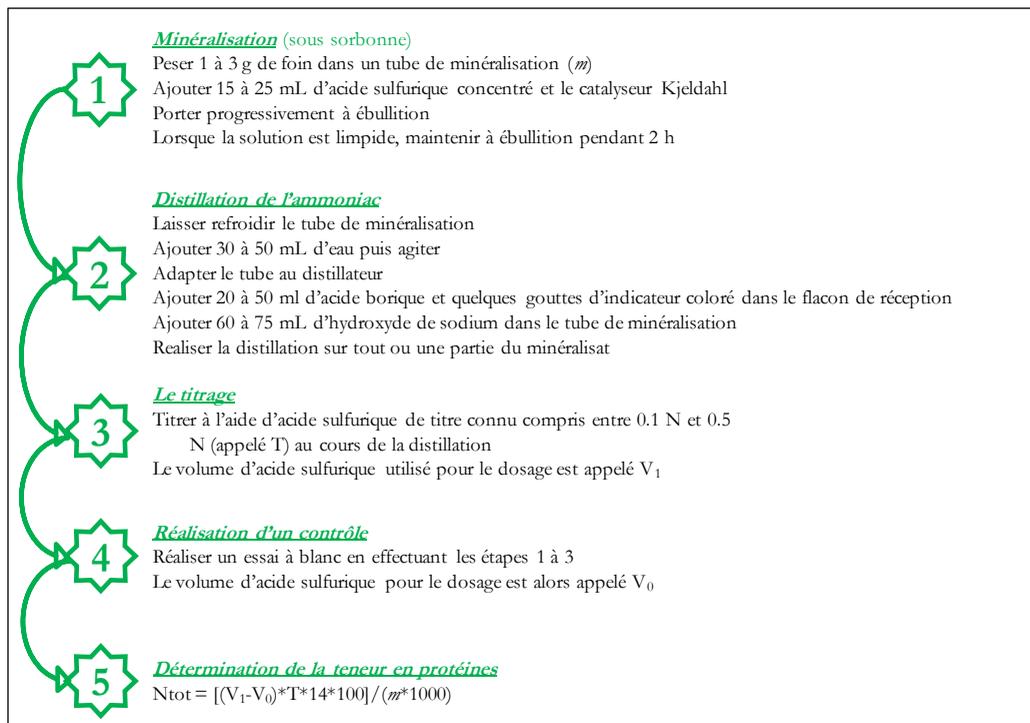


Figure 51 : Protocole de dosage des protéines brutes selon la méthode Kjeldahl (Norme AFNOR, NF V 04-407).

II.2 Evaluation de la qualité nutritive

La qualité nutritive des foins a été évaluée par la détermination de la masse sèche et de la masse minérale mais également par la quantification de la cellulose brute et des protéines brutes. Les analyses de cellulose brute et de protéines brutes ont été effectuées par le LDFD14. Seuls certains foins produits lors la deuxième année de production (témoins, les enrubannés, foins avec des additifs, ...), les foins monospécifiques ainsi que les foins commerciaux ont fait l'objet de ces analyses.

II.2.1 Détermination de la masse sèche et minérale

A partir des 100 g de foin broyés pour les analyses des mycotoxines, 15 g ont été aliquotés puis séchés à 100 °C dans une étuve jusqu'à obtenir une masse constante. A l'issue de ce séchage, la masse sèche est déterminée puis exprimée en $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de foin.

Pour déterminer la masse minérale, 5 g de foin séchés à 100 °C (± 0.001 gr) sont prélevés, placés dans un godet en porcelaine puis incinérés à 550°C durant 5 h environ (ISO 2002). La masse des cendres est ensuite pesée afin de déterminer la masse minérale des foins exprimée en $\text{gr}\cdot\text{gr}^{-1}$ de foin ainsi qu'en pourcentage de matière sèche des poussières.

II.2.2 Quantification de la cellulose brute

La quantification de la cellulose brute permet d'une part d'estimer la valeur énergétique des aliments et d'autre part, d'évaluer leur qualité nutritive. La fraction de cellulose brute peut contenir entre 40 à 100 % de cellulose, entre 15 et 20 % d'hémicellulose et entre 5 et 90 % de lignine selon l'échantillon analysé (Mertens, 2002). La quantification de la cellulose brute a été réalisée selon la méthode de Weende et comporte 9 étapes (Norme AFNOR, EN ISO 6865, 2002) résumées au travers de la figure 50.

II.2.3 Quantification des protéines brutes

La quantification des protéines brutes permet de déterminer la valeur azotée d'un aliment et par conséquent d'évaluer sa valeur nutritive. Le protocole utilisé est issu de la méthode Kjeldahl et comporte 5 étapes (Norme AFNOR, NF V 04-407, 2002) résumée dans la figure 51.

III. Analyses statistiques

Deux types d'analyses statistiques ont été utilisés : les analyses univariées et les analyses multivariées.

III.1 Analyses univariées

L'analyse des effets des traitements ou du type de fourrage sur les paramètres de qualité sanitaire à savoir les poussières, les organismes fongiques, les endotoxines et les pollens, a été réalisée à l'aide du logiciel Minitab 13 for Windows Version 13.31 (2000). Les données ont été soumises à des analyses de variance (ANOVA), après s'être assuré de leur normalité par un test de Ryan-Joiner pour vérifier la normalité des données et un test de Bartlett pour vérifier l'homogénéité des variances. 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 paramétriques 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 & Rohlf, 2003).

III.2 Analyses multivariées

Dans un premier temps, afin de confronter les critères d'évaluation de la qualité sanitaire des foins, une Analyse en Correspondances Principales (ACP) a été réalisée sur l'ensemble des données concernant les foins produits expérimentalement en 2007 et 2008 à l'aide du logiciel ADE-4 (Thioulouse *et al.*, 2001). Les critères d'évaluation de la qualité sanitaire utilisés pour cette analyse sont la quantité de poussière, de moisissures et de pollens mais également le pourcentage de contamination par le sol des poussières et l'indice de Shannon et Weaver permettant d'évaluer la diversité fongique.

Dans un second temps, afin d'évaluer l'influence des conditions météorologiques lors de la récolte (vitesse du vent, température extérieure et pluviométrie) ainsi que de l'humidité à la récolte et à l'analyse mais aussi de la densité de la botte, deux Analyses en Composantes Principales sur Variables Instrumentales (ACPVI) ont été réalisées. Ces dernières ont pour objectif de visualiser et d'interpréter les corrélations entre le tableau de variables de réponse

(Traitements * Critères d'évaluation de la qualité) et le tableau des variables explicatives qui sont pour l'ACPVI 1, les conditions météorologiques et pour l'ACPVI 2, les caractéristiques, humidité et densité, des bottes de foin. Pour chacune des ACPVI, les relations canoniques globales entre les deux tableaux de variables ont été testées par un test de permutation.

RESULTATS

Résultats - CHAPITRE I

“Effet des facteurs agricoles et environnementaux sur la qualité sanitaire du foin impliquée dans les maladies pulmonaires équinés”

RESULTATS - CHAPITRE I

Effect of agricultural and environmental factors on the hay characteristics involved in equine respiratory disease.

Virginie Séguin¹, Servane Lemauiel-Lavenant¹, David Garon², Valérie Bouchart³, Yves Gallard⁴, Benoit Blanchet⁴, Sylvain Diquélou¹, Emmanuelle Personeni¹, Pascal Gauduchon², Alain¹ Ourry

Article accepté dans Agriculture, Ecosystem and Environment en Septembre 2009

¹ UMR INRA 950 Ecophysiologie végétale, Agronomie et Nutritions N, C, S, IFR 146 ICORE, Esplanade de la Paix, Université de Caen Basse-Normandie, 14032 Caen Cedex, France

² GRECAN EA1772 - IFR 146 ICORE, Université de Caen Basse-Normandie et Centre François Baclesse, Avenue du Général Harris, 14076 Caen Cedex 05, France

³ Laboratoire Départemental Frank Duncombe, Conseil Général du Calvados, 14053 Caen cedex 4, France.

⁴ Unité Expérimentale INRA du Pin, Domaine de Borculo, 61310 Exmes, France.

Key words: breathable dust; Recurrent Airway Obstruction; endotoxin; grassland; fungi; mycotoxin; pollen.

Préambule

A partir de l'analyse bibliographique, plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'effet de certaines pratiques culturales, des conditions météorologiques ou de la composition floristique sur la qualité sanitaire des fourrages.

Au travers de la première expérimentation, nous avons voulu réaliser une étude préliminaire en testant **l'effet de certaines pratiques culturales et conditions météorologiques sur la qualité sanitaire des fourrages et ainsi identifier des facteurs influençant cette dernière**. Une expérimentation au champ a, été mise en place afin de tester les hypothèses suivantes :

- 1) Un pâturage équin préalable ou la présence de taupinières peut influencer la qualité sanitaire du foin,
- 2) La période de récolte (précoce ou tardive) influence la qualité sanitaire des fourrages,
- 3) Une coupe des regains permet de réduire la contamination par les pollens,
- 4) La hauteur de coupe affecte la qualité du foin,
- 5) Le niveau d'humidité du foin, à la récolte et au cours du stockage, influence la contamination par les poussières et les champignons, des fourrages,
- 6) Le taux de pressage affecte la qualité sanitaire,
- 7) Un séchage en grange du foin accroît la qualité sanitaire des fourrages,
- 8) Une pluie après coupe affecte la qualité sanitaire des foins.

Une prairie permanente homogène dominée par une flore typique de Normandie, a été choisie pour réaliser cette étude. Cette prairie a été subdivisée en 15 placettes de 650m² sur lesquelles les différents traitements ont été appliqués, par exemple, une pluie après coupe, un fanage tardif, un séchage en grange ou encore de l'enrubannage.

Certains traitements ont été récoltés en période précoce (juin) et d'autres en période tardive (juillet). La parcelle témoin de la période précoce a également été soumise à une seconde coupe. Une fois récolté, les foins issus des différentes placettes ont été analysés en terme de contamination par les poussières, les champignons, les pollens, les mycotoxines, les endotoxines mais également par le sol.

Ce chapitre a été accepté le 22 septembre 2009 à *Agriculture, Ecosystem and Environment*.

Abstract

It is now widely recognized that an environmental approach to the prevention of equine Recurrent Airway Obstruction (RAO), resulting from recurrent exposure to dust and aeroallergens, requires closer consideration. The aims of this study were to quantify the dust and aeroallergens in hays in order to characterize the health quality of hay, to identify the most variable parameters and determine which climatic factors and agricultural practices improve the health quality of hay. Hays were experimentally produced from a homogeneous grassland by applying different agricultural practices and rainfall amounts. Treatment effects were evaluated by dust and aeroallergen quantifications and identifications. The highest fungal contamination in airborne particles and dust contamination during late harvest, occurred when hay moisture remained high during (rainfall after cut) or after the making process (baled at 75 % DM). *Eurotium amstelodami* and *E. repens* were mainly found in all hays, while *Aspergillus fumigatus* was mostly found in hays showing the highest colony forming units (CFUs). Barn drying increased dust content and haylages produced the lowest level of airborne particles. The highest levels of endotoxins were found in the hay harvested at 75% of dry matter and the hay exposed to a rainfall after cut. The presence of zearalenone was only detected in these two low quality hays. Overall results suggest that better agricultural practices for hay making can be adopted and may be used in combination to significantly improve the health quality of hay, leading to a lower long-term exposure of horses.

I. Introduction

Grasslands constitute one of the major agro-ecosystems for livestock nutrition, used either for direct grazing and/or harvesting for forage storage. The latter has been intensively optimized and mechanized during the last 5 decades, to increase the efficiency of this labour intensive process and to increase harvested biomass. While increasing nutritive value for cattle has been largely studied, little attention has been given to the hygiene quality of hay in relation to health risks for the animal consumers and for farmers. Horses, compared to other agricultural animals, are long-lived and their athletic ability is closely linked to their respiratory well-being.

Poor quality hay for horse feeding along with environmental housing, including bedding, is known as one of the major determinants that triggers respiratory disease. Amongst them Recurrent Airway Obstruction (RAO) also known as “heaves” or Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is recognized as the most prominent pathology (Robinson, 2001). RAO is an airway obstruction of mature horses that is reversed by a change in environment or use of bronchodilators (Robinson, 2001). It is characterized by airway neutrophilia, bronchial hyper-responsiveness and increased mucus production and, as a consequence, can quickly hamper horse performance. In addition, its incidence also appears to be related to the type of horse housing environment where exposure to high dust density may be related to hay storage and the use of straw bedding. Bowles *et al.* (2002), indicate that RAO and summer pasture associated obstructive pulmonary disease (SPAOPD) are of the most common respiratory diseases with up to 50% of horses affected worldwide. Similarly, Bracher *et al.* (1991) found a prevalence of roughly 50% in Swiss horses. A recent survey of horse owners in Great Britain (Hotchkiss *et al.*, 2007) found a mean occurrence of RAO of 14% statistically linked to exposure to hay, and increased horse age, while the risk is supposed to be higher for horses which have had respiratory infection in early life.

The etiopathogenesis of RAO is unknown, although it is widely accepted that dust and aeroallergens from hay and bedding may be involved. Indirect evidence may be found because the reversibility of this lung disease may be achieved by different methods applied alone or in association, for example when : i) affected horses are returned to pasture, in order to reduce contact with hay and straw (McPherson *et al.*, 1978 ; Vandenput *et al.*, 1998); ii) hay is soaked prior to feeding (Raymond *et al.*, 1997), which is a common practice recently shown to reduce breathing zone respirable dust concentration (Clements & Pirie, 2007); iii) alternative feeding is provided such as haylage, silage or pelleted diet (Woods *et al.*, 1993 ; Vandenput *et al.*, 1997 ; Raymond *et al.*, 1997; McGorum *et al.*, 1998 ; Clements & Pirie, 2007) and iv) better barn environment is obtained by the use of low dust bedding material such as wood shaving (Woods *et al.*, 1993 ; McGorum *et*

al., 1998 ; Clements & Pirie, 2007), cardboard (Kirschvink *et al.*, 2002) or recycled and pelleted newspaper (Ward *et al.*, 2001), and/or increased ventilation (Sainsbury, 1981 ; Curtis *et al.* 1996).

Amongst factors in hay or bedding materials that are widely recognized to trigger RAO are: small size, and therefore, breathable organic dust (Raymond *et al.*, 1994 ; Vandenput *et al.*, 1997, McGorum *et al.*, 1998); pollens (Ward & Couëtil, 2005); moulds, in particular *A. fumigatus* (Clarke & Madelin, 1987 ; Wittenberg *et al.*, 1996 ; Vandenput *et al.*, 1997 ; Ward & Couëtil, 2005), and endotoxins (McGorum *et al.*, 1998 ; Pirie *et al.*, 2003). No data are available on the involvement of mycotoxins in RAO onset but the presence of toxigenic species like *A. fumigatus* in molded hay (Wittenberg *et al.*, 1996) could play a possible role in RAO. Some of these factors may affect the animal in a synergistic manner.

It is now widely recognized that an environmental approach to the prevention of RAO requires closer consideration. Most of the work so far has concentrated on new methods to detect clinical and sub-clinical RAO-affected horses and to improve the environment and the feeding of affected horses. Surprisingly, only little attention has been given, to our knowledge, to the prevention of RAO by increasing hay quality through optimized agronomic practices. The only available studies were not related to horse RAO but to farmer's lung disease (FLD), an extrinsic allergic alveolitis, which is also supposed to be induced by mouldy plant materials such as hay (Dalphin *et al.*, 1991; Reboux *et al.*, 2001; Roussel *et al.*, 2004; Reboux *et al.*, 2006). These authors performed microbial analysis of hay samples collected from farms of France or Finland with or without cases of FLD, and that use different methods of haymaking. They found, for example, that microbial contamination was decreased by lowering the bale density and also by barn drying with heating, a method more regularly used in Finland.

Therefore, the aims of this study, using the same grassland i.e. with the same floristic composition under the same climatic conditions were to assess the effects of agricultural practices, grassland perturbation and simulated rainfall on hay quality evaluated considering different parameters such as total and breathable dust, fungal, pollen, mycotoxin, endotoxin and soil contamination. Therefore, sub-plots were exposed to different disturbances (presence of molehills, dung deposition to simulate a previous grazing), rainfall simulation after harvest, different heights of cutting, harvest at different dry matter content, early or late harvest, field or barn drying or haylage production.

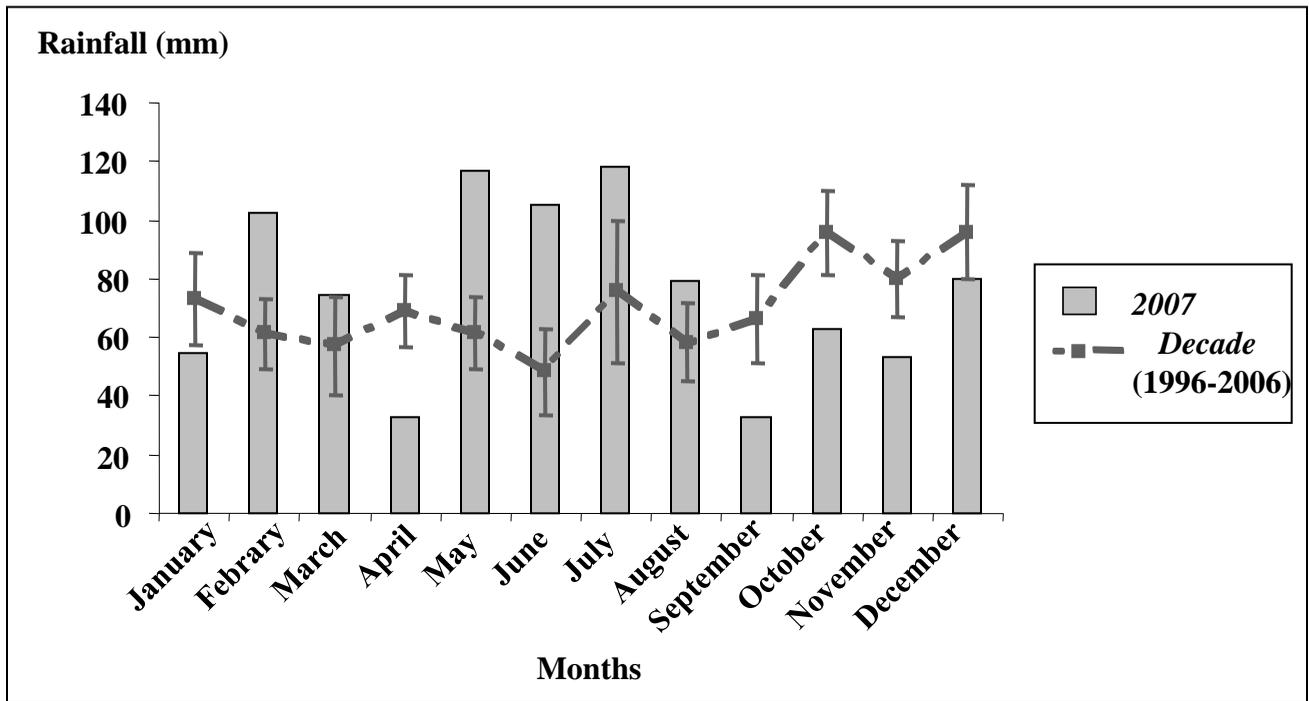


Figure I-1 : Monthly rainfall data during 2007, compared to the last 10 year averages, obtained from the meteorological data of INRA experimental unit of le Pin-au-Haras.

II. Materials and Methods

II.1 Study site and experimental design

The study was carried out in the INRA experimental unit of Pin-au-Haras (Normandy, France, 48°77'N, 0°13'W, 205 m). The climate is temperate with an average annual temperature of 10°C and an average annual rainfall of 780 mm. Nevertheless, the meteorological condition of the year 2007 was atypical because, in the months May, June and July, the rainfall was 340 mm instead of an average of 180 mm recorded for the 10 previous years (Figure I-1).

A permanent grassland of 4.96 ha was chosen for this study because its flora is typical of Normandy grasslands. *Poa trivialis*, *Alopecurus geniculatus*, *Holcus lanatus*, *Ranunculus repens*, *Trifolium repens* and *Lolium perenne* are the main species with a Braun-Blanquet coefficients of 5, 4, 3, 3, 2 and 2 respectively (Braun-Blanquet, 1964). This grassland had been submitted for a long time to a lime application (1.6 t.ha⁻¹) every 4 years, alternately with an organic fertilisation (16 to 18 t.ha⁻¹ applied as manure) every 2 years, to 3 annual (spring, after the first cut and the second cut) applications of N fertilizer for a total of 150-180 kg N.ha⁻¹, to an annual chemical treatment of weeds, and to the destruction of molehills.

In March 2007, thirteen sub-plots of 660 m² were delineated in a homogeneous area and separated from each other by a corridor of 1.2 m in order to avoid edge effect between treatments.

Two periods of cut and hay harvest were chosen according to usual practices and weather conditions: June, 4th 2007 (early harvest), and July, 26th 2007 (late harvest). In June, *Poaceae* were at the beginning of ear emergence and in July, for most of them flowering were finished. For both early and late harvest, the grass in the control plot was cut at 5 cm, tossed, according to meteorological conditions, one-two times a day until harvest, and the hay baled at 85 % DM in low density square bales (116 kg.m⁻³ in average). In the remaining sub-plots, different agricultural practices and/or climatic conditions were applied because of an empirical or a supposed effect on hay quality.

A the early harvest time, only two different agricultural practices were applied and compared to control, barn drying and haylage. In the first case, the shoots obtained from grassland, were cut and tossed as previously described, then harvested in loose at 65 % DM, put in a drier and dried at 25 °C using a heating ventilation, before baling at 85 % DM in low density square bales. In the second case, the shoots obtained from grassland cut and tossed as previously described, were harvested at 65 % DM, baled in low density square bales and surrounded by 12

layers of plastic film to produced haylage. These treatments were compared to control of the early harvest.

At the late harvest time, the effect of two cut heights (3 and 7 cm) to affect putative soil contamination, were compared with the control. Two pasture disturbances due to molehill invasion or to a previous grazing by horses were simulated by distributing the 26th March 2007, one molehill or one horse dung every 10 m². A late tossing carried out 48 h after cut which is a frequent practice in Normand stud farms and a higher baling density (134 kg.m⁻³), were also considered. In an other subplot, the shoots obtained from grassland cut and tossed as previously described, were also harvested at 65 % DM, baled in low density square bales and surrounded by 12 layers of plastic film to produced haylage.

Two simulated 10 mm rain showers were applied, on an other subplot, at about 5 pm, at 24 and 48h after shoot cut. After each rainfall simulation, the hay was tossed and, after the second rainfall, it was harvested at 85 % DM.

In a further subplot, the hay was harvested at 75 % DM and baled in low density square bales in order to study the effect on fungi contamination.

Each sub-plot was sampled by collecting randomly six hay bales were used for further analysis.

II.2 Hay quality measurements

For each hay bale, dry matter content and hay density was measured at harvest and during storage. Then, breathable dust content, mould density, pollen, endotoxin and mycotoxin concentrations were determined.

II.2.1 Quantification of breathable dust

The quantification of breathable dust was adapted from Vandenput *et al.* (1997) and standardised after preliminary trials to reduce variability of measurements. An hermetic glove box (200 L) was connected to a gas compressor allowing a constant air flow (200 L.min⁻¹), after previous removal of environmental dusts using a disposal filter capsule glass microfiber media with polypropylene housing (600 cm², Whatman HEPA-CAP[™] 36). The glove box was connected to a second hermetic box (80 L) which contained an aerosol dust counter (Grimm Model 1.108, GmbH and CoKG) with a sample flow rate of 1.2 L.min⁻¹. This system included an optical chamber in which particles of different size categories (from 0.3 to 20 µm) were counted. For each hay bale, ten samples of 100 g DM were analysed and hays from each treatment were

submitted to 40 dust analyses. Each sample was sealed in a hermetic plastic bag, and further introduced into the glove box. Then, dust-free air was flushed during about 15 min, until no dust was detectable. The hay sample was then released from the plastic bag using sealed gloves, and mixed for 30 sec. Airborne dust quantification was then realised for 30 min. Particles were collected on one PolyTetraFluoroEthylene (PTFE) filter (0.2µm of pore size) for microbiological analysis. Filters were kept at 4°C, until analysis.

II.2.2 Mycological analysis

Each PTFE filter was divided in 4 pieces and suspended in 5 mL of sterile water containing Tween 80 (0.05 %, w/v). After 30 min of magnetic shaking at 420 rpm, three dilutions of the suspension (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) were realised. One mL of each dilution (triplicate) was deposited in a Petri dish (90 mm diameter) and the culture medium constituted by malt extract (1.5 %) / agar (1.5 %) medium (MEA) complemented with chloramphenicol (0.05 %, w/v) was poured over it following the soil plates method of Warcup (1950). The plates were incubated at 25 and 30°C and the colony forming units (CFUs) of culturable fungi were counted after 3 and 7 days of incubation. Fungal concentration, expressed as the colony forming units per cubic meter of air (CFUs m⁻³) was determined. The colonies were identified after subculturing on MEA. *Aspergilli* and *Penicillia* were cultured and identified on Czapek yeast autolysate agar (CYA) and 25 % glycerol nitrate agar (G25N) (Pitt, 1979), and *Fusaria* on potato dextrose agar medium (PDA) (Booth, 1966). The purity of each strain and its identity were checked through macro- and microscopic examinations (Pitt, 1979; Domsch *et al.*, 1980; Von Arx, 1981; Klich, 2002; Samson *et al.*, 2002; Samson & Frisvad, 2004). For each treatment, the mycofloral diversity was determined by Shannon & Weaver index (Shannon & Weaver, 1949).

II.2.3 Liquid extraction of dust

For each hay bale, 100 g of hay were sampled and shaken for 30 min with 1.5 L of distilled water to determine the pollen concentration, the endotoxins concentration and the mineral matter content of dust to estimate the soil contamination

II.2.3.1 Pollen quantification

Five replicates of 100 µL from the above solution were analysed by mounting microscope slides according to the Wodehouse method with glycerine jelly stained with basic fuchsin (Wodehouse, 1971). Then, microscope slides were examined under a Nikon inverted microscope DIAPHOT-TMD (Nippon Kogaku K.K., Tokyo, Japan). Pollens were counted and identified.

II.2.3.2 Mineral mass of dust and soil contamination

1L of the above solution was filtered on ashless filter (90 mm diameter) using a Büchner funnel connected to a flask. The filters were then dried at 100°C until constant mass for dry matter determination before burning at 550°C for 48h in order to determine the ash content. The contamination of dust by soil was therefore estimated according to the following expression:

$$\% \text{ soil contamination} = [(\% \text{ ash} - 6) * 100] / (90 - 6)$$

where

% ash = Percent of ashes obtained after combustion

and considering that ash content of plant material was 6 % while % ash determined from soil samples was about 90%.

II.2.3.3 Extraction and quantification of endotoxins

Endotoxin concentration was evaluated by the semi-quantitative method of gel-clot LAL (*Limulus* Amebocyte Lysate) based on the reaction between LAL and endotoxins (Levin & Bang, 1968). 0.1 mL of the above solution used at three dilution levels (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) were added to 0.1 mL of Endosafe[®] LAL reagent (U.S. Licence No. 1197, Charles Rivers Laboratories). Tubes were incubated at 37°C for 60 min and the reaction was then stopped at 180°C. Negative (with apyrogen water) and positive (standard solution of endotoxins) controls were also performed. Endotoxin concentration, expressed in Endotoxin Unit (EU), was estimated by multiplying the LAL labelled sensitivity ($0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ for this study) by the reciprocal of the dilution coefficient. The results (R) of the endotoxins analyses were categorised as follows : Grade I : $1.875 \times 10^4 \text{ EU g}^{-1}$ of hay $< R \leq 1.875 \times 10^5 \text{ EU g}^{-1}$ of hay, Grade II : $1.875 \times 10^5 \text{ EU g}^{-1}$ of hay $< R \leq 1.875 \times 10^6 \text{ EU g}^{-1}$ of hay, Grade III : $1.875 \times 10^6 \text{ EU g}^{-1}$ of hay $< R \leq 1.875 \times 10^7 \text{ EU g}^{-1}$ of hay, Grade IV : $1.875 \times 10^7 \text{ EU g}^{-1}$ of hay $< R \leq 1.875 \times 10^8 \text{ EU g}^{-1}$ of hay and Grade V : $1.875 \times 10^8 \text{ EU g}^{-1}$ of hay $< R$. Endotoxin analyses were carried out only on hays from treatments that had an effect on quality.

II.2.4 Evaluation of mycotoxin contents in hays

For each bale, 100 g of hay DM were randomly selected and homogenized in a blender, then an aliquot of 5 g was weighed in an Erlenmeyer flask. Sixteen mycotoxins (aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂, aflatoxin M₁, alternariol, citrinin, diacetoxyscirpenol, fumagillin, fumonisin B₁, fumonisin B₂, gliotoxin, ochratoxin A, T-2 toxin, verruculogen, zearalenone) were extracted with 100 mL of a mixture of methanol/water (80:20, v/v) using an

Table I-1: Main parameters used for quantification of mycotoxins in hay by HPLC-MS.

Mycotoxins	RT ^a (min)	Monitored ions (m/z) ^b	Quantification ion (m/z) ^b	Analytical recovery (%)	Quantification limit (mg/kg)
Aflatoxin B ₁	14.6	335 (+) 647 (+)	313 (+)	97	0.1
Aflatoxin B ₂	12.9	316 (+) 651 (+)	315 (+)	91	0.1
Aflatoxin G ₁	12.6	330 (+) 351 (+)	329 (+)	90	0.1
Aflatoxin G ₂	11.1	332 (+) 683 (+)	331 (+)	100	0.1
Aflatoxin M ₁	10.1	351 (+) 679 (+)	329 (+)	97	0.1
Alternariol	16.1	258 (-) 259 (+)	257 (-)	89	0.1
Citrinin	16.5	233 (+) 273 (+)	251 (+)	42	0.15
Diacetoxyscirpenol	13.7	307 (+) 349 (+)	389 (+)	80	0.15
Fumagillin	25.8	458 (-) 539 (-)	457 (-)	44	0.1
Fumonisin B ₁	17.6	723 (+) 724 (+)	722 (+)	96	0.05
Fumonisin B ₂	21.0	707 (+) 708 (+)	706 (+)	78	0.05
Gliotoxin	12.1	245 (+) 227 (+)	263 (+)	76	0.1
Ochratoxin A	23.1	405 (+) 406 (+)	404 (+)	58	0.1
T-2 toxin	21.8	484 (+) 305 (+)	489 (+)	32	0.2
Verruculogen	24.6	495 (+) 410 (+)	494 (+)	62	0.1
Zearalenone	22.9	318 (-) 319 (+)	317 (-)	45	0.1

Ultra-Turrax basic T25 homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany), then shaken on a rotary shaker for 60 min at 100 rpm and finally centrifuged at 7000 rpm for 15 min (10 °C).

A volume of 15 mL of the supernatant obtained from the previous centrifugation was diluted in 90 mL of Milli-Q water, acidified with 400 µL of acetic acid and was then purified through Oasis HLB (6 mL, 200 mg) cartridge (Waters, Milford, MA, USA), previously conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of Milli-Q water. The cartridge was washed with 2 mL of Milli-Q water. Mycotoxins were eluted with 5 mL of methanol followed with 10 mL of methylterbutyl ether (MTBE)/methanol (90:10, v/v). The eluted mycotoxins were evaporated in a parallel evaporator (Syncore polyvap, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) and dried under a stream of nitrogen. The final residue was dissolved in 1 mL of a mixture of acetonitrile/water (10:90, v/v) and then filtered through Millex HV 0.45 µm before injection into HPLC-MS.

Liquid chromatography was performed using Agilent Technologies series 1100 (Palo Alto, CA, USA) quaternary pump coupled with an autosampler and a SL model mass spectrometry detector. The analytes were chromatographed at 40°C on a 150 x 2.1 mm i.d., 5 µm, Zorbax SB-C₁₈ column (Agilent Technologies) with a Securityguard cartridge C18 4 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Mycotoxins were separated using an elution gradient with acetonitrile (solvent A) and water acidified with 0.5% acetic acid (pH 3) (solvent B). The gradient program was: at time zero, 5% solvent A; linear gradient to 15% solvent A within 3 min; to 30% solvent A in 11 min; and to 50% solvent A in 6 min; and finally, to 70 % solvent A in 7 min. The flow rate was 400 µL min⁻¹. The sample injection volume was 10 µL.

Mass spectrometry was performed on a quadrupole analyzer equipped with electron spray ionization (ESI) source and operating in positive and negative modes. The parameters used for the mass spectrometer in all experiments were as follow: capillary voltage, 3.0 kV; solvent gas, 720 L/h; evaporation temperature, 350 °C; pressure of nebulisation, 35 psig.

The ions monitored, the analytical recoveries and the quantification limits are presented in Table I-1.

II.3 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out with the statistical software MINITAB (version 13.20, copyright 2000). Since the experimental data do not fit the parametric test, the effect of treatments were analysed using the non-parametric test of Kruskal-Wallis and then the signed rank test (Sokal & Rohlf, 2003).

Table I-2 : Total airborne dust and breathable dust (diameter < 5 μm , n = 40) and mean concentrations (n=4) of viable spores estimated from colony forming units per cubic meter (CFUs m^{-3}) after growth at 25°C or 30°C, in the different experimentally produced hays. Mean values with different letters are significantly different (P < 0.05, Kruskal-Wallis test). Bold characters distinguish treatment significantly different from control.

Treatments		10^5 particles. g^{-1} of hay				10^3 CFUs m^{-3}			
		Total airborne dust		Breathable dust		At 25°C		At 30°C	
		Mean	(sd)	Mean	(sd)	Mean	(sd)	Mean	(sd)
Early harvests	Control	387	(15) ^b	368	(15) ^b	475	(223) ^{ab}	501	(217) ^{ab}
	Barn drying	509	(22)^{de}	485	(21)^{cd}	29	(9) ^a	27	(11) ^a
	Haylage	4	(1)^a	4	(1)^a	11	(6) ^a	12	(6) ^a
Late Harvests	Control	422	(20) ^{bc}	405	(20) ^{bc}	102	(68) ^a	78	(44) ^a
	Cut at 3 cm	553	(20)^{de}	526	(19)^d	49	(7) ^a	43	(10) ^a
	Cut at 7 cm	592	(23)^e	566	(22)^d	94	(49) ^a	61	(31) ^a
	Molehill	487	(27) ^{cd}	465	(25) ^{bc}	82	(48) ^a	66	(38) ^a
	Horse dung	710	(30)^f	672	(28)^e	120	(69) ^a	90	(52) ^a
	Higher density baling	463	(16) ^{cd}	436	(15) ^c	1051	(380)^b	893	(359)^b
	Late tossing	430	(20) ^{bc}	389	(17) ^b	1572	(554)^b	1437	(605)^b
	Harvest at 75% of DM	861	(55)^f	818	(54)^e	1954	(810)^b	1638	(714)^b
	Rainfall after shoot cut	1479	(126)^g	1399	(121)^f	22153	(12393)^c	18947	(10709)^c
	Haylage	8	(1)^a	8	(1)^a	5	(2) ^a	3	(2) ^a
Second crop	Control	514	(27)^{de}	487	(25) ^{cd}	302	(72) ^a	289	(55) ^a

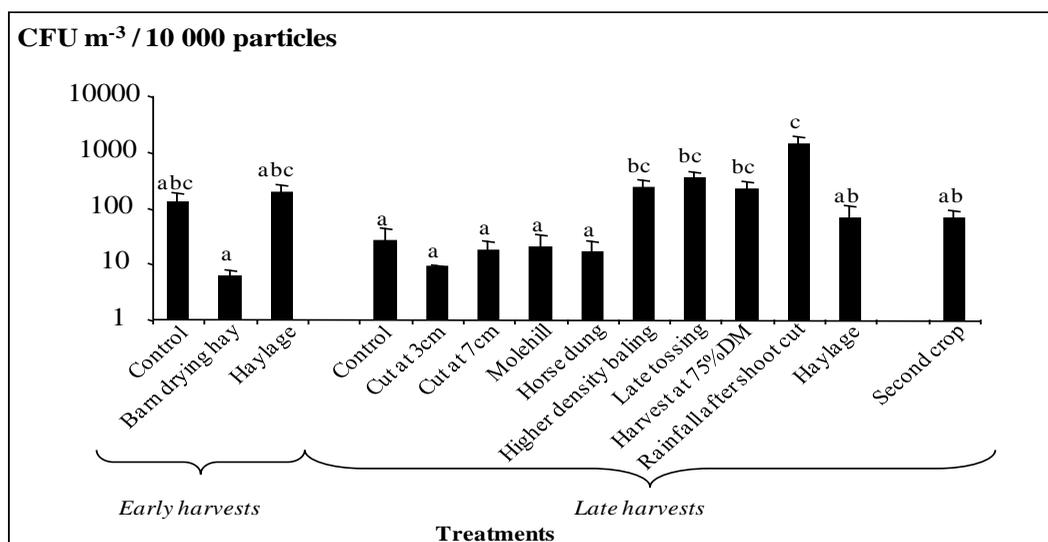


Figure I-2 : Quantity of viable spores at 25°C estimated from colony forming units per cubic meter (CFUs m^{-3}) after growth at 25°C for 10 000 particles in the different experimentally produced hay. Data are in logarithmic scale. Mean values (n=4) with different letters are significantly different (P < 0.05).

III. Results

III.1 Dustiness of hays

The amount of total airborne dust and breathable dust particles with a diameter lower than 5 µm (Table I-2), when all treatments are considered, were highly correlated ($R^2=0.99$, $p<0.001$), with breathable dust accounting for 94.7 % of total dust. When treatments are considered individually, harvesting and therefore baling at lower dry matter content (75 instead of 85 %) significantly increased the amount of total and breathable dust, but to a lesser extent than a 20 mm rain simulation after cut. In such cases, breathable dust increased, respectively, by 2.1 and 3.5 fold in comparison with the control treatment. Haylage reduced the dust particles by 50-100 fold in comparison with both the control treatment carried out at early and late harvest. While barn dried hay, produced only at early harvest contained slightly higher total and breathable dusts than hays obtained by cutting the grass at 3 and 7 cm from soil, a horse dung application simulating a previous grazing, caused a significant increase in both parameters. All the remaining treatments, grassland perturbation by molehills, higher density baling, late tossing, early, late or second harvest, did not affect significantly the hay dustiness (Table I-2).

III.2 Fungal contamination of airborne dust

Total airborne dust was not significantly correlated with the amount of CFUs grown at 25 or 30 °C (Table I-2), meaning that hay contamination by mould CFUs cannot be deduced from dustiness. The lack of correlation between CFUs and dustiness can be explained by the different density of spore moulds given for 10,000 dust particles (Figure I-2). The highest values of CFUs m^{-3} of air varied from 3×10^3 to 2×10^7 CFUs m^{-3} (Table I-2). When airborne particles were collected and grown at 25 or 30 °C for quantification of CFUs, it appeared that the number of CFUs were highly correlated for the 2 growth temperatures ($R^2=0.99$, $p<0.001$). On average, the number of CFUs obtained at 30 °C represented 85 % of those found at 25 °C. Higher density baling, late tossing, harvest at 75 % dry matter, rain simulation after cut, increased significantly the amount of CFUs at 25 °C by a mean factor of 10.3, 15.4, 19.1 and 217 respectively compared to the late harvest control treatment. Similar increases were found when airborne CFUs were grown at 30°C. Higher density baling, late tossing, lower dry matter at harvest, and after cut rain strongly increased the amounts of CFUs for a given amount of dust (Figure I-2), suggesting that these treatments increased mould propagation. On the other hand, haylage airborne particles

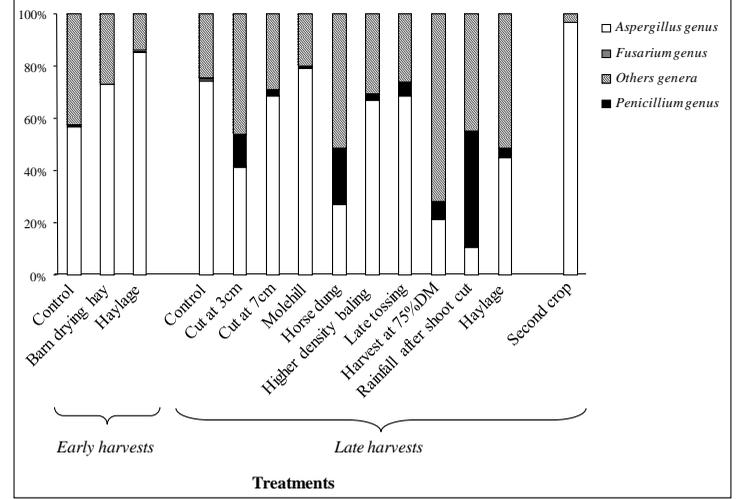
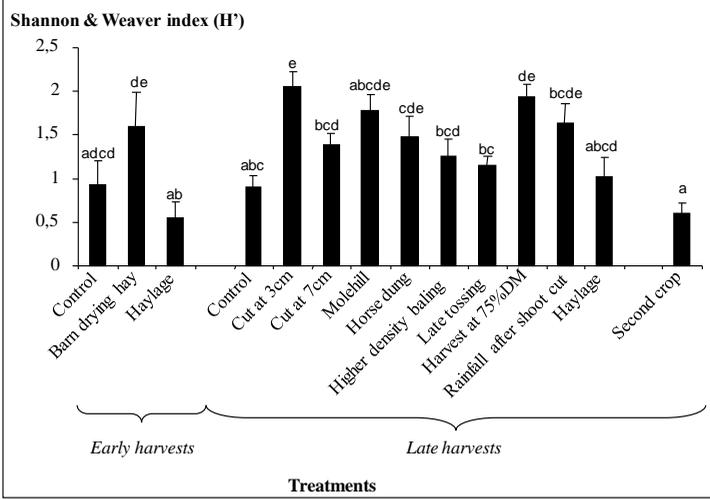


Figure I-3 : Shannon and Weaver H' values estimated for the mycoflora in airborne dust at 25°C in the different experimentally produced hays. Mean values (n=4) with different letters are significantly different (P < 0.05).

Figure I-4 : Distribution of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and other genera obtained at 25°C in airborne dust contained in the different experimentally produced hays.

Table I-3 : Mean concentrations (n=4) of viable spores of *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and the other genera estimated from colony forming units per cubic meter (CFUs m⁻³) after growth at 25°C, in the different experimentally produced hays.

Treatments		Total		Other genera		Aspergillus genus		Fusarium genus		Penicillium genus	
		mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd
Early harvests	Control	474589	(223035)	201313	(111478)	269688	(111755)	0	0	3588	(2985)
	Barn drying hay	29150	(8653)	7949	(3840)	21201	(5514)	0	0	0	0
	Haylage	10804	(3015)	1523	(640)	9221	(2467)	0	0	60	(62)
Late harvests	Control	102184	(32684)	25151	(11293)	76016	(22050)	662	(466)	354	(370)
	Cut at 3cm	48612	(6334)	22471	(3679)	20031	(3270)	328	(342)	5783	(1467)
	Cut at 7cm	94127	(23329)	27210	(8047)	64383	(15904)	0	0	2534	(1228)
	Molehill	82282	(24005)	16528	(6095)	65204	(20190)	0	0	550	(351)
	Horse dung	119846	(33733)	61964	(18087)	31950	(12436)	0	0	25932	(8307)
	Higher density baling	1051214	(186232)	325211	(136293)	706242	(124707)	0	0	19761	(12666)
	Late tossing	1572076	(270784)	411941	(104944)	1076205	(177257)	0	0	83931	(59382)
	Harvest at 75%DM	1953685	(386210)	1399721	(379219)	417199	(59173)	5692	(5945)	131073	(42739)
	Rainfall after shoot cut	22152546	(5875016)	9941087	(2413022)	2374571	(542106)	0	0	9836887	(3244397)
Haylage	4824	(1274)	2486	(1246)	2150	(575)	0	0	188	(102)	
Second crop	Control	301696	(42536)	9616	(5245)	292080	(40399)	0	0	0	0

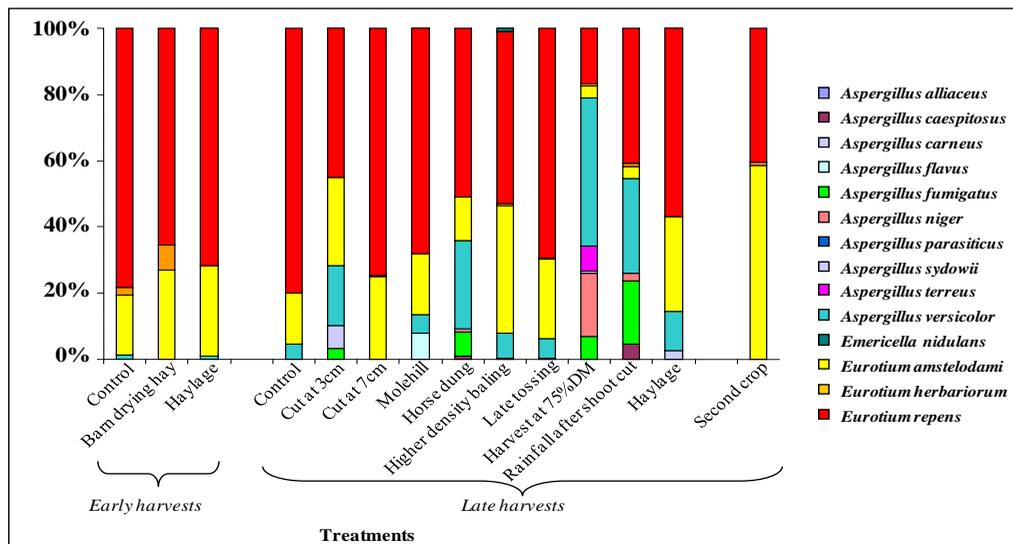


Figure I-5 : Distribution of *Aspergillus* and *Eurotium* species obtained in airborne dust at 25°C contained in the different experimentally produced hays.

contained similar amount of mould spore, but was less dusty than control treatment. Only barn drying, although producing slightly more breathable dust (Table I-2) seemed to be a treatment that reduced mould contamination (Figure I-2).

Sixty two fungal species were detected in the experimentally produced hays. According to the Shannon and Weaver index, the treatments showing the largest fungal diversity were: low cutting level (3 cm), harvest at 75% of dry matter and rain after cut (Figure I-3). *Aspergillus* and related genera (*Emericella*, *Eurotium*) were predominant with 14 species identified in the analysed hays, accounting for more than 50% of total fungi counted after growth at 25 or at 30°C in most treatments (Figure I-4, Table I-3). In airborne dust, *Eurotium repens* and *E. amstelodami* were the main species associated with the analysed samples apart from those obtained from the most contaminated hays (75 % DM and treated with 20 mm rain after cutting)(Figure I-5). *A. versicolor* was found only in hays collected during late harvest, while *A. fumigatus* was detected at 25 °C and even more at 30 °C in hays showing the highest CFUs contents (higher density baling, 75 % DM and post-cut rain) (Figure I-5). This species was also found when grassland was cut at 3 cm and when the presence of horse dung simulated the effect of a previous grazing. Other fungal species were found more sporadically: *E. herbariorum* was only found at early harvest in the control and in the barn dried hays, while *A. niger* was isolated from the hays showing the highest CFUs number (Figure I-5). In experimentally produced hays, 9 *Penicillium* species were identified. Among them, *P. implicatum*, *P. islandicum*, *P. lividum* and *P. verruculosum* were predominant. Only two *Fusarium* species were identified in hays: *F. proliferatum* was identified in control of the early harvest and in hay harvested at 75 % of DM and *F. verticillioïdes* in control of the early harvest and hay cut at 3 cm. Among the species belonging to other genera, *Alternaria alternata* and *Cladosporium cladosporioides* were found in the majority of hays with 60 to 3245 CFUs m⁻³ and 124 to 7184 CFUs m⁻³ respectively (Table I-4). *Scopulariopsis brevicaulis*, *Acremonium* spp. and *Stachybotrys chartarum* were more related to specific treatments (Table I-4).

III.3 Pollen content

The amounts of pollen obtained by liquid extraction were in the range 3 x 10³ to 162 x 10³ pollen grains per g of dry matter of hay, and differed for some specific treatments. They were higher for haylage and lower with a simulated rain after cut or for the second regrowth harvested (Table I-5). Since the same grassland was used for the hay production, no difference in floristic composition of pollens was observed. The main pollens found in hays were from *Poaceae* spp., *Plantago* spp., *Pinus* spp., *Asteraceae* spp. and *Betula* spp.

Table I-4 : Mean concentrations (n=4) of viable spores of other allergenic or/and potentially toxicogenic species estimated from colony forming units per cubic meter (CFUs m⁻³) after growth at 25°C, in the different experimentally produced hays.

Treatments		<i>Acremonium bacillisporum</i>		<i>Acremonium roseum</i>		<i>Alternaria alternata</i>		<i>Cladosporium cladosporoides</i>		<i>Gliocladium roseum</i>		<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>		<i>Stachybotrys chartarum</i>	
		Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd
Early harvests	Control														
	Barn drying hay					3180 (1511)		801 (925)				60 (62)			
	Haylage							131 (136)							
Late harvests	Control					354 (370)									
	Cut at 3cm	334 (348)				668 (470)		1336 (595)							310 (323)
	Cut at 7cm	319 (332)						1266 (744)							
	Molehill					1603 (757)		325 (338)							
	Horse dung					351 (366)		548 (389)							
	Higher density baling					3245 (3389)									
	Late tossing				4890 (5107)			7184 (5385)		2463 (2572)					
	Harvest at 75% DM				5556 (3912)			3019 (3153)							
	Rainfall after shoot cut											241546 (134469)			
	Haylage	60 (62)				60 (62)		124 (87)				64 (67)			
Second crop	Control														

Table I-5 : Pollen, dry and mineral mass and soil contamination contained in total dust of different experimentally produced hays, obtained by liquid extraction. Mean values (n=4) with different letters are significantly different (P<0.05, Kruskal-Wallis test).

Treatments		Pollen		Dust dry mass		Ash content		Soil contamination	
		number g ⁻¹ of hay	Mean (sd)	mg.g ⁻¹ of hay	Mean (sd)	percent	Mean (sd)	percent	Mean (sd)
Early harvests	Control	69663	(8340) ^{bc}	5.05	(0.86) ^a	51	(3) ^{bcd}	54	(4) ^{bcd}
	Barn drying	90792	(19124) ^{cd}	11.49	(6.05) ^a	54	(1) ^c	57	(1) ^c
	Haylage	162863	(30579) ^e	3.48	(1.03) ^a	60	(8) ^{cde}	64	(9) ^{cde}
Late harvests	Control	72973	(3855) ^c	2.48	(0.35) ^a	39	(1) ^a	39	(1) ^a
	Cut at 3 cm	75253	(16625) ^{bcd}	4.46	(2) ^a	48	(7) ^{abcd}	50	(9) ^{abcd}
	Cut at 7 cm	64703	(10233) ^{bc}	3.72	(0.89) ^a	42	(3) ^{ab}	43	(4) ^{ab}
	Molehill	62372	(11107) ^{bc}	3.32	(1.2) ^a	42	(4) ^{ab}	42	(5) ^{ab}
	Horse dung	75494	(11582) ^c	4.9	(1.83) ^a	40	(12) ^{abcd}	41	(14) ^{abcd}
	Higher density baling	52372	(8546) ^b	4.81	(1.63) ^a	52	(5) ^{bcd}	54	(6) ^{bcd}
	Late tossing	73120	(15701) ^{bcd}	5.66	(2.95) ^a	40	(12) ^{abcde}	41	(15) ^{abcde}
	Harvest at 75% of DM	61368	(4945) ^{bc}	34.32	(26.52) ^{ab}	69	(9) ^{bcd}	75	(11) ^{bcd}
	Rainfall after shoot cut	32660	(12628) ^b	78.83	(26.68) ^b	79	(5) ^c	81	(5) ^c
	Haylage	122993	(15647) ^{de}	7.55	(2.39) ^a	47	(6) ^{abc}	48	(7) ^{abc}
Second crop	Control	3219	(452) ^a	3.41	(0.57) ^a	33	(5) ^{ab}	32	(6) ^{ab}

III.4 Soil contamination

The total amount of particles obtained from liquid extraction (Table I-5, i.e. breathable and of larger sizes) was correlated ($R^2= 0.62$, $p<0.001$) with the amount of breathable dust, which therefore cannot replace the time-consuming particle counter use. Only the hay harvested after a rain simulation contained a significantly higher amount of liquid extracted dust, while hay harvested at 75 % dry matter also showed higher values. The higher mineral mass evaluated in this fraction of the above mentioned-hays reached 79 and 69 % mineral content, suggesting a high soil contamination. This last parameter has been evaluated (Table I-5) by comparing the mineral mass of liquid extracted dust to mineral content of plant material (average value of 6% of dry matter). It suggested that soil contamination was higher in early compared to late harvested hays, in hay obtained from low cut (3 cm), as well as in high density baling, hay harvested at 75 % dry matter or hay exposed to a rain simulation after the cut.

III.5 Endotoxin content in hays

Analysis demonstrated the presence of endotoxins in the range 1.875×10^4 (Grade I) to 1.875×10^8 (Grade IV) EU g^{-1} of hay. The most endotoxin contaminated hays were those harvested at 75% of dry matter (Grade III) and the hay exposed to rain after cutting (Grade III and IV). For controls, endotoxin concentrations varied between 1.875×10^4 and 1.875×10^5 EU g^{-1} of hay (Grade I), while for the remaining treatments, concentrations observed were in the range of Grade II.

III.6 Mycotoxin contents in hays

Mycotoxin quantification has revealed the presence of zearalenone only in the hay harvested at 75 % of dry matter and in the hay exposed to a rainfall after cutting, for which the concentration varied respectively from 0.816 to 152 mg kg^{-1} and from 14 to 89 mg kg^{-1} . Moreover, a trace of alternariol (0.6 mg kg^{-1}) was found in the hay exposed to rainfall after cutting.

Amongst all parameters used to evaluate hay quality in this study (Table I-6) which all showed significant variation between treatments, the highest source of variability illustrated by coefficient of variation, obtained for all treatments were in the following increasing order: i) ash dry mass of liquid extracted particles and soil contamination (25 and 27%), ii) fungal diversity at 30 and 25 °C evaluated by Shannon & Weaver Index (31 and 36%); iii) pollen density (51%); iv) total

Table I-6 : Effect of treatments on parameters used to evaluate health quality. Coefficient of variation (sd / mean) and significancy were determined for all treatments (**p < 0,001; *p < 0,01; *p < 0,05).

	CV (%)	P
Total airborne dust	67	***
Breathable dust	67	***
CFUs m ⁻³ at 25°C	292	***
CFUs m ⁻³ at 30°C	290	***
CFUs for 10 ⁴ particles at 25°C	185	***
CFUs for 10 ⁴ particles at 30°C	180	***
Shannon and Weaver values at 25°C	36	***
Shannon and Weaver values at 30°C	31	***
Pollens	51	***
Ash dry mass	25	*
Soil contamination	27	**

and breathable airborne dust (67%); v) amount of CFUs for 10^4 airborne particles (180 and 185 % at 25 and 30°C respectively) and finally, vi) the highest variation was found for number of CFUs (290 and 292 % at 25 and 30°C respectively).

IV. Discussion

Grassland when not used directly for grazing by cattle, is largely used mostly and traditionally for hay, secondarily and more recently for silage and haylage productions. Although it is well known that hay may contain numerous compounds that can trigger pulmonary diseases in humans (FLD) and animals such as horses (RAO), little attention has been given to methods that may reduce dust and aeroallergens contained in hay and, thus, to improve the health quality of this product. However, this can be difficult to achieve as the etiology of such diseases is still relatively unknown but it is generally admitted that different compounds of hay may be synergistically involved, while their effects occur after long-term exposure. These include organic and breathable dust, pollen, moulds and toxins such as mycotoxins or endotoxins. To our knowledge, very little information is available on strategies that can be used to optimize the quality of hay in order to reduce the prevalence of pulmonary diseases. Only studies on FLD compared hays obtained under different conditions and relied on microbiological analysis (Dalphin *et al.*, 1991; Reboux *et al.*, 2001; Roussel *et al.*, 2004; Reboux *et al.*, 2006). They showed that the higher density of bales (Reboux *et al.*, 2006), harvesting conditions with rainfall occurrence, or the first crop compared to a second crop increased the density of fungi.

IV.1 General effects of treatments on hay quality

A large range of agricultural practices that are supposed to affect *a priori* the quality of hay was used in this experiment. Some did not reveal any significant effect such as N fertilisation and were not reported. In this study, no effect of floristic composition was observed on dust and aeroallergens composition because the work was carried out on homogenous grassland.

For all other treatments, fungal populations were the most affected (Table I-6) through the amount of fungal spores found in breathable dust (around 290 % variation amongst all treatments), their density (around 180 %) per 10^4 particles of airborne dust and species richness (around 33% %). Total airborne or breathable dust showed a 67 % variation amongst treatments, while soil contamination was less affected with 27 % variation. Dustiness of hay (Table I-2) was decreased in haylage and increased when initial humidity was (baled at 75 % DM instead of 85 %)

or remained high during making process (rain simulation after cutting). The latter two treatments led to a higher amount of CFUs found in the breathable fraction (Table I-2), and were similar to two other treatments (late tossing and high bale density) that resulted in slower drying during hay making and storage, respectively. Therefore, a general trend appears for all treatments: mould multiplication as well as an increase of airborne particles occurred mostly between cutting and harvest and possibly after baling because hay moisture content was too high, which consequently is of prime importance for its quality. To our knowledge, this is, for example, the first report that considers the effects of agricultural practices on hay dustiness.

Conversely, haylage, with fairly high humidity forage in bales wrapped in multiple layers of plastic to reduce oxygen diffusion, was characterised by lower breathable dust containing very few fungal spores (strong trend for early and late harvest but not significant in our study, Table I-2) as previously reported (Raymond *et al.*, 1997; Vandenput *et al.*, 1997). Similarly, quicker drying in a barn with moderate heating, although increasing breathable dust by 31%, show a trend for the reduction of the amount of fungal spores in the breathing area of horses, but again it not statistically significant (Table I-2).

Dustiness of hay was also increased with a height of cut of 3 cm or 7cm compared to control. It could be hypothesized that, at 3 cm, hay was contaminated by soil and at 7 cm, hay being drier, plant material was submitted to more damage by mechanical tossing and thus dust content was increased.

IV.2 Mycoflora found in hays and putative involvement in pulmonary diseases

The microbiological parameters, particularly the fungal diversity, were the most affected by treatments. For example, the H' diversity index (Figure I-3) was doubled by low height of cutting (3 versus 7 cm). Indeed, in this last hay, species known to develop in soil like *Stachybotrys chartarum* and *Phoma* spp (Domsch *et al.*, 1993) have been isolated (Table I-4), indicating contamination with soil fungi. In the same way, the diversity of *Aspergillus* genus increased in hay receiving a rainfall after cut or harvested at 75% of dry matter (Figure I-5). These two last treatments as well as the late tossing and the high bale density that induced a slower drying during hay making and storage, led to a higher amount of CFUs found in the breathable fraction. Moisture appears then to be the main determining factor in fungal contamination. Reboux *et al.* (2006) showed that higher density of bales, harvesting following recent rain, or the first crop compared to a second crop increased the density of fungi such as *Absidia (Mycocladus) corymbifera* and *Eurotium amstelodami* which for the second species is in accordance with our results (Figure I-5).

Among the *Aspergillus* group, the main species identified in airborne dust were *Eurotium repens* and *Eurotium amstelodami* (Figure I-5). The latter was previously described in hays and was suspected to play a role in farmer's lung disease (FLD), a form of extrinsic allergic alveolitis observed with farmers handling hays (Reboux *et al.*, 2001). It could be suggested that prolonged exposure to inhaled fungal spores of *Eurotium amstelodami* should be also investigated as a possible etiological agent of RAO.

We noted also the presence of other *Aspergillus* species like *Aspergillus fumigatus* that was found only in hays which showed the highest CFUs records (Figure I-5 and Table I-2). *Aspergillus versicolor* was a species recorded in late harvested hays but was not detected in early harvested hays nor in second crop. Two others species (*Aspergillus sydowii* and *Aspergillus flavus*) appeared in specific treatments that were supposed to increase soil contaminations (lower height of cutting and molehills).

Several fungi such as *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Emericella nidulans*, *Eurotium amstelodami* and others genera (*Cladosporium*, *Penicillium*, *Stachybotrys*) were previously described in hay (Clarke and Madelin, 1987; Reboux *et al.*, 2001; Reboux *et al.*, 2006). Our results further show that these moulds are able to produce spores recovered in breathable dust. According to a study performed by Reboux *et al.* (2001) on the microbiological analyses of air during the workshift in farms, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus fumigatus* and *Emericella nidulans* were also identified in airborne dust.

Several *Aspergilli* were previously described in equine disorders such as rhinitis, sinusitis and rhinopharyngitis (Guida *et al.*, 2005; Kendall *et al.*, 2008). *Aspergillus fumigatus* could also lead to pulmonary equine diseases like RAO (Richard & DeBey, 1995). Other fungal species also identified in dust are responsible for respiratory diseases. For example, *Scopulariopsis brevicaulis* was frequently involved in respiratory allergy (Kurup *et al.*, 2000), *Alternaria* spp and *Cladosporium* genus in asthma (Bush & Prochnau, 2004; Denning *et al.*, 2006) and *Acremonium* in pulmonary infection (Pusterla *et al.*, 2005).

IV.3 Endotoxins and mycotoxins

As for other parameters, the highest levels of toxins were also found in the hay harvested at 75 % of dry matter and the hay exposed to rainfall after cutting. Airborne endotoxins have been incriminated in pulmonary diseases particularly in humans (Lundholm *et al.*, 1986; Olenchock *et al.*, 1986) but their exact role still remained unknown in humans and horses (Mc Gorum *et al.*, 1998). Because studies reported in the literature report quantification of endotoxins in airborne dust of

the breathing zone around the horse nostril or stall (McGorum *et al.*, 1998; Berndt *et al.*, 2008), our data obtained from liquid extracted dust cannot be compared.

Among the sixteen analysed mycotoxins, only zearalenone was detected in the two worst hays (harvest at 75% of dry matter and rainfall after cut). Zearalenone is a phenolic resorcylic acid lactone produced by some *Fusaria* such as *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. These species are known to develop in cereals and particularly in the field (Coulombe, 1993; Cheeke, 1995). The major effects of zearalenone are estrogenic and animals the most commonly affected are pigs. Concerning horses, the effects of zearalenone have only been demonstrated in a few cases. For example, Raymond *et al.* (2003; 2005), reported the influence of zearalenone, administered at a low dose, on performance and hematological parameters. However, these *Fusarium* species which produced zearalenone were not detected in airborne dust of the two concerned hays and it may be suggested that the spores of *Fusaria* remained in the hay where zearalenone concentrations found were quite high (between 0.816 to 152 mg kg⁻¹).

IV.5 Pollens

As the same grassland was used for all treatments, it was not expected to find great variation in pollen contents, which may also act as aeroallergens. Surprisingly, haylage contained a high amounts of pollen compared to dry hays, while rainfall after cutting decreased it. The pollens were trapped by humidity in haylage during harvest and were washed out by successive precipitations in the rainfall after cut treatment. The period of cut also plays a role on the presence of pollens. Indeed, in the hay harvested in the second crop, anthesis was finished and pollen quantity decreased significantly (- 95 %). However it should be kept in mind that we have extracted pollen from hay while its allergenic effect is supposed to involve the breathable fraction.

V. Conclusion

Among all the parameters used to assess the quality of hay, fungal diversity and the production of breathable dust were the most sensitive parameters to agricultural practices and climatic factors. This quality was affected by agricultural practices and appeared to be closely associated with moisture content during cutting, tossing, harvesting and storing of hay. This study suggests that hay quality can be improved by the use of different agricultural practices (moderate height of shot cutting, early tossing, lower density baling, baled at least at 85% dry matter, avoiding grassland previously grazed or hay produced with rainfall during making process, or alternatively

harvested as haylage) that may be combined in order to decrease as soon as possible forage humidity and therefore decreased dust accumulation and fungal contamination. It suggests that agricultural practices could be selected to improve its quality, reducing the risk of long term exposure and as a consequence, limit respiratory damage in humans (farmers) and RAO in horses. However, more knowledge is still required to determine how plant species composition will affect dustiness and mould species richness, how agricultural practices can be used synergistically and finally if mould production can be decreased by alternative treatments.

Acknowledgements

This work was partly funded through a PhD Grant to V. SEGUIN from the “Conseil Régional de Basse-Normandie” while this project has been approved by the “Pôle de Compétitivité Filière Equine”. Authors would like to acknowledge the staff of the INRA experimental unit of Borculo (P. GEORGET, S. CLOUARD, T. CORBET, M. AUBRY, B. GUIBOUT, J. LEVALLOIS and M. ROUILLON), from Laboratoire Départemental Frank Duncombe (M. HOUSSIN and R. PICQUET) and from UMR INRA EVA (D. BALLOIS, R. SEGURA and A.F. AMELINE) for their kind and skilful support as well as B. de LOYNES D’ESTREE for her efficient help with hay dust analysis. We would also like to acknowledge Mrs Susan FROUD and Dr Anthony GORDON for improving the English of the manuscript.

Résultats - CHAPITRE II

*"Comment améliorer les qualités nutritive et
sanitaire des foins destinés à l'alimentation
équine ?"*

RESULTATS - CHAPITRE II

How to improve the nutritive and health quality of hays for horse feeding

Virginie Séguin¹, David Garon², Servane Lemauviel-Lavenant¹, Caroline Lanier², Valérie Bouchart³, Yves Gallard⁴, Benoit Blanchet⁴, Sylvain Diquélou¹, Emmanuelle Personeni¹, Pascal Gauduchon², Alain Ourry¹.

Article prochainement soumis à Animal Feed Science and Technology

¹ UMR INRA 950 Ecophysiologie végétale, Agronomie et Nutritions N, C, S, IFR 146 ICORE, Esplanade de la Paix, Université de Caen Basse-Normandie, 14032 Caen Cedex, France

² GRECAN EA1772 - IFR 146 ICORE, Université de Caen Basse-Normandie et Centre François Baclesse, Avenue du Général Harris, 14076 Caen Cedex 05, France

³ Laboratoire Départemental Frank Duncombe, Conseil Général du Calvados, 14053 Caen cedex 4, France.

⁴ Unité Expérimentale INRA du Pin, Domaine de Borculo, 61310 Exmes, France.

Key words: breathable dust; Recurrent Airway Obstruction; grassland; moulds; mycotoxin; pollen

Préambule

La première expérimentation au champ, nous a permis de mettre en évidence l'effet de certaines pratiques culturales et conditions météorologiques en vérifiant les hypothèses suivantes :

- 1) La présence de taupinières ou d'un pâturage préalable n'influence pas la qualité sanitaire
- 2) La période de récolte influence la qualité sanitaire et notamment la contamination par le sol des foin,
- 3) Une seconde coupe permet de réduire la contamination par les pollens,
- 4) La hauteur de coupe influence la qualité sanitaire des foin et plus particulièrement la quantité de poussières et la diversité fongique,
- 5) Le niveau d'humidité du foin, à la récolte et au cours du stockage, influence la contamination par les poussières et les champignons, des fourrages,
- 6) Un séchage en grange du foin améliore la qualité sanitaire des fourrages, et notamment réduit la contamination par les organismes fongiques,
- 7) Une pluie après coupe affecte négativement la qualité sanitaire des foin.

Lors d'une deuxième année de production expérimentale de fourrages, notre objectif était de **confirmer l'effet de certains traitements ayant eut des effets sur la qualité, lors de la première année de production** tels que la pluie après coupe, l'enrubannage ou encore le séchage en grange mais aussi **de tester de nouveaux traitements** tels que les additifs de conservation ou une pluie avant coupe.

Les nouveaux traitements testés vont permettre de confirmer ou non les hypothèses suivantes :

- 1) Des fanages supplémentaires permettent d'améliorer le séchage et par conséquent la qualité sanitaire des foin,
- 2) L'utilisation d'additifs de conservation permet de réduire la prolifération fongique d'un foin récolté à 85 % MS,
- 3) L'utilisation d'additifs de conservation permet de réduire la prolifération fongique d'un foin récolté à 75 % MS,
- 4) Une pluie avant coupe affecte la qualité sanitaire des foin.

La même prairie a été utilisée et le protocole expérimental comprend 18 placettes de 600 m². A la suite des différentes récoltes, les foin ont été soumis aux analyses de valeur sanitaire

utilisées dans le chapitre I mais également à des analyses de valeur alimentaire afin de mettre ou non en évidence une possible relation entre la qualité sanitaire et nutritive.

Ce chapitre sera soumis prochainement à *Animal Feed Science and Technology*.

Abstract

Improving the health quality of forages for horse nutrition seems to be a reasonable target for decreasing the prevalence of recurrent airway obstruction (RAO), a prominent pulmonary disease in horses, by reducing the chronic exposure of horses to aeroallergens. The aim of the experiment was to study the effects of different agricultural practices, rainfall occurrence, time of harvest, and alternative biological preservatives on the main aeroallergens contained in forages including breathable dust, fungi contamination, mycotoxins and pollens. Results showed that the late harvest of hay, a second crop or a haylage production provides a good alternative to increase health quality without affecting its nutritive value, by reducing fungi contamination and breathable dust content., Barn drying of hay, while having no effect on breathable dust, similarly reduced fungi contamination. In contrast, when hay was harvested at a lower dry matter content (75 instead of 85 %), both breathable dust and fungi contaminations were increased, which could at least be reversed by adding propionic acid just before baling. The mycotoxin, zearalenone, was detected in different hays, and even in one case, in breathable dust. Overall, our data suggest that different approaches can be used to increase forage health quality for horse feeding and thus reduce their exposure to factors involved in RAO aetiology.

I. Introduction

Pulmonary diseases are the prominent cause of a reduction in horse performance in the Northern Hemisphere, where horses can spend most of the time in stalls. Among them, Recurrent Airway Obstruction (RAO) has become a major concern for horse owners. RAO also known as heaves or Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), which is similar to asthma in humans, is an inflammatory obstructive lower airway disease of the adult horse. It is characterized by variable clinical signs ranging from exercise intolerance to mucus secretion or chronic cough, to expiratory dyspnea (Lowell, 1990; Mair & Derksen, 2000) and can lead in extreme cases to death. The RAO aetiology is not precisely known but it seems to be associated with chronic and long-term exposure to dust containing environmental aeroallergens that originate from hay and straw. According to Clarke *et al.* (1987) and Burrell (1985), a high concentration of airborne dust increases both the severity and duration of the disease. Several aeroallergens have already been incriminated in RAO aetiology (Vandenput *et al.*, 1997; McGorum *et al.*, 1998) : breathable dust as physical particles (Vandenput *et al.*, 1997), fungal spores such as *Aspergillus fumigatus* (Clarke & Madelin, 1987; Vandenput *et al.*, 1997 ; Ward & Couëtil, 2005), pollens (Ward & Couëtil, 2005) and endotoxins (McGorum *et al.*, 1998 ; Pirie *et al.*, 2003). Because moulds are possibly involved in RAO, mycotoxins could be incriminated.

The environmental control of breathing zone around horses, including a decrease in airborne dust concentrations, appears essential to reduce the prevalence of RAO (Clements & Pirie, 2007). Horse breeders have already adapted their management by keeping horses longer in pasture (McPherson *et al.*, 1978; Vandenput *et al.*, 1998), using forages and straws that are only slightly dusty such as haylage and pellets (Woods *et al.*, 1993 ; Vandenput *et al.*, 1997 ; Raymond *et al.*, 1997, McGorum *et al.*, 1998 ; Clements & Pirie, 2007), increasing stall ventilation (Sainsbury, 1981 ; Curtis *et al.* 1996) or soaking hay (Moore-Colyer, 1996; Blackman & Moore-Colyer, 1998). However, the improvement of hay quality could be also a reasonable target. Hay quality should now be improved.

Some studies have been performed to improve the health quality of hay to prevent a human form of pulmonary disease, Farmers Lung Disease (FLD), which is also associated with inhaling dust from mouldy straw and hay (Gregory & Lacey, 1968; Blyth, 1973, Kotimaa *et al.*, 1984). For horses, only a few investigations have been undertaken on the health quality of hay and towards reduction in the prevalence of equine pulmonary disease. Most of them have concerned mould contamination. Both bad meteorological conditions (rainfall) during harvest and the harvest of hay containing more than 20 % water results in the proliferation of fungi during

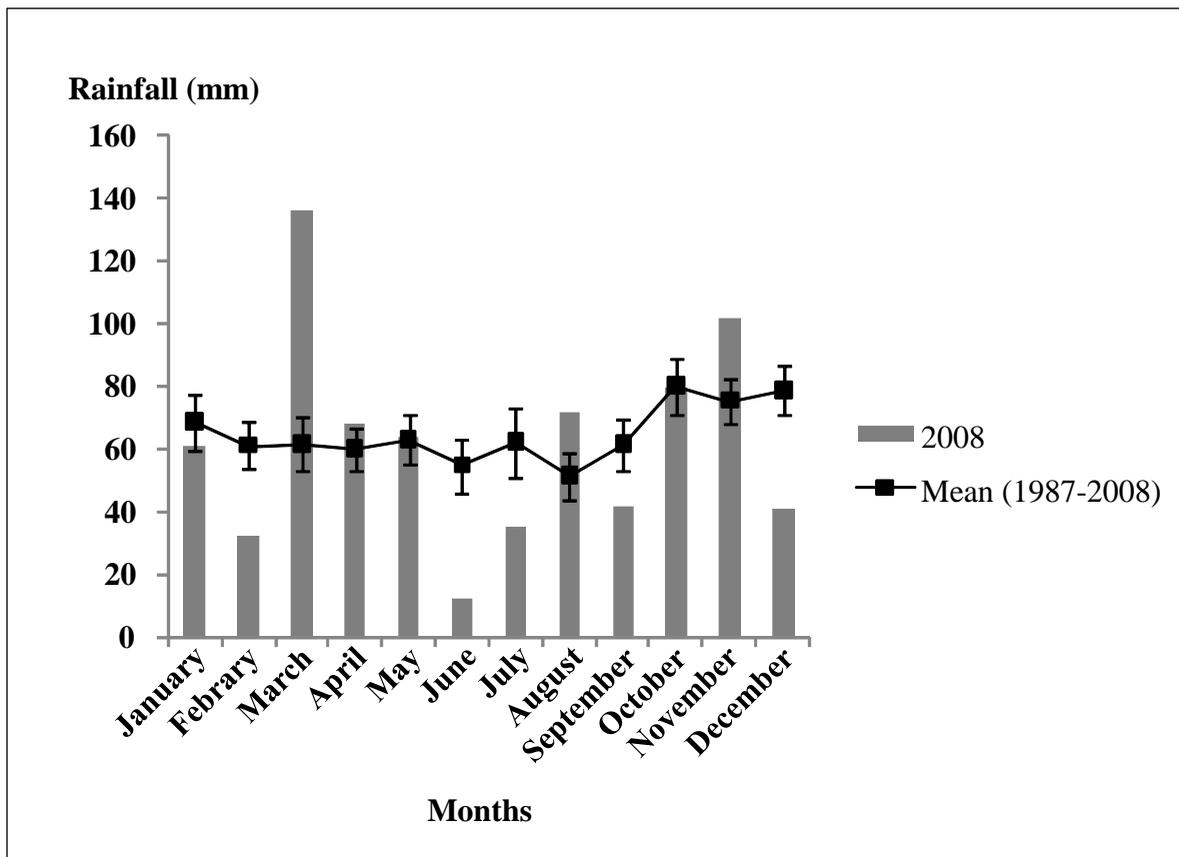


Figure II-1 : Monthly rainfall data during 2008, compared to the average of the last 20 years, obtained from the meteorological data of the INRA experimental unit of Le Pin au Haras.

storage, increase mould contamination (Gregory *et al.*, 1963; Terho *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 2002; Roussel *et al.*, 2004; Séguin *et al.*, In press). Alternatively, barn drying as well as the use of hay preservatives such as propionic acid, allow a reduction in mould proliferation (Dalphin *et al.*, 1991; Reboux *et al.*, 2002). Besides, hay contaminated by soil appears to increase the mould concentration and modify fungal diversity (Roussel *et al.*, 2004; Séguin *et al.*, In press).

Optimising the nutritive value of hay in order to increase milk and meat production is now well documented for cattle breeding (Sutton, 1989; Allen, 1996; Morel *et al.*, 2006). For horses, even if performance is conditioned by hay quality, the literature about the nutritive and health qualities of hay is sparse (Martin-Rosset 1990) and more research is obviously needed.

The main aim of this study was to evaluate the impact of several agricultural practices and making processes on hay quality. It integrates both nutritive quality and health quality, which was defined by all the aeroallergens possibly incriminated in RAO aetiology (breathable dust, mould, pollen, endotoxins and mycotoxins). A homogeneous grassland was divided so as to apply different treatments: molehill deposition that may increase soil contamination, rainfall simulation before and after harvest, harvest at different dry matter content, early or late harvest, field or barn drying, haylage production and use of hay preservatives. These experimentally produced hays were then compared so as to determine which practices improve nutritive and health qualities of hay.

II. Materials and Methods

II.1 Study site and experimental design

The study was carried out in the INRA experimental unit of Pin-au-Haras (Normandy, France, 48°77N, 0°13W, 205 m). The climate is temperate with an average annual temperature of 10 °C and an average annual rainfall of 780 mm. During summer 2008, the conditions of hay harvest were favourable because in June and July, rainfalls were below the mean of the previous 20 years (Figure II-1).

A permanent grassland of 4.96 ha was chosen for this study because its flora is typical of Normandy grasslands. *Poa trivialis*, *Alopecurus geniculatus*, *Holcus lanatus*, *Ranunculus repens*, *Trifolium repens* and *Lolium perenne* are the main species with Braun-Blanquet coefficients of 5, 4, 3, 3, 2 and 2 respectively (Braun-Blanquet, 1964). This grassland has been subjected for a long time to a lime application (1.6 t.ha⁻¹) every 4 years, alternately with organic fertilisation (16 to 18 t.ha⁻¹ applied as manure) every 2 years, to 3 annual (spring, after the first cut and the second cut) applications of

N fertilizer for a total of 150-180 kg N.ha⁻¹, to an annual chemical treatment of weeds, and to the destruction of molehills.

In April 2008, eighteen plots of 600 m² were delineated in a homogeneous area and separated from each other by a corridor of 2 m in order to avoid the hedge effect between treatments.

Two periods of cutting and hay harvesting were chosen according to usual practices and weather conditions: on June 7th 2008 (early harvest), and on July 15th 2008 (late harvest). In June, the *Poaceae* were at the beginning of ear emergence and by July flowering was finished for most of them. For both early and late harvest, the grass in the control plot was cut at 5 cm, tossed once or twice a day until harvest according to the meteorological conditions, and the hay baled at 85 % DM in low density square bales (116 kg.m⁻³ in average). In the remaining sub-plots, different agricultural practices and/or climatic conditions were applied because of an empirical or a supposed effect on hay quality:

- Agricultural practices consisting of: (i) harvesting and baling at 75 % dry matter, (ii) harvesting and baling at 65 % dry matter corresponding to haylage, with bales surrounded by 12 layers of plastic film, (iii) baling after barn drying (shoots were harvested at 65 % dry matter and dried loose in a drier at 25 °C with heating ventilation, before baling at 85% dry matter), (iv) a late first toss occurring 48 h after cutting shoots, which is a frequent practice in Norman stud farms, (v) a greater number of tosses (7 versus 5 tosses), (vi) a molehill invasion which can occur when they are not destroyed, simulated by an application on June 25th 2008 of one molehill every 10 m².
- Two commercial hay preservatives, a solution of propionic acid buffered with sodium benzoate (CleanGrain liquid, 5 L t⁻¹ of hay provided by Biomin, Parc Technologique du Zoopôle, rue Irène Joliot-Curie, 22440 Ploufragan, www.biomin.nat) and lactic bacteria (20 g t⁻¹ of hay), were also tested before baling of a hay harvested at 85 % dry mass or harvested at 75 % dry mass. These hay preservatives were applied to the hay with a vaporiser before baling.
- Meteorological conditions were modified artificially to increase the humidity of cut shoots before baling, by simulating 2 rainfalls of 10 mm, 24 and 48 h before and after cutting shoots.

Each plot was sampled by selecting six hay bales at random, and these were subsequently used for analysis.

II.2 Hay quality measurements

For each hay bale, dry matter, mineral content and hay density were measured at harvest and during storage. Then, the nutritive value and health quality (meaning breathable dust content, mould density as well as pollen, endotoxin and mycotoxin concentrations) were evaluated.

II.2.1 Nutritive quality

Nutritive quality was evaluated by crude fibre and crude protein quantification. Crude fibre corresponds to the cellulosic components of cell walls and crude protein to the nitrogenous constituents of forage. For each hay bale, an aliquot of 100 g of hay was dried at 100 °C over 24 h up to constant mass.

Mineral content was determined by the mass remaining after heating 5 g of dried hay in a furnace at 550 °C for 5 h (ISO 5984, 2002). The crude protein (CP) concentration was determined by the Kjeldahl method (Bradstreet, 1965) and the concentration of crude fibre (CF) by the Weende method (Hennerberg & Stohmann, 1859; Naumann & Bassler, 1988).

II.2.2 Health quality

II.2.2.1 Quantification of breathable dust

The quantification of breathable dust was adapted from Vandenput *et al.* (1997) and standardised after preliminary trials to reduce the variability of measurements. A hermetic glove box (200 L) was connected to a gas compressor allowing a constant air flow (200 L min⁻¹), after removal of environmental dusts using a disposable filter capsule with glass microfibre media with polypropylene housing (600 cm², Whatman HEPA-CAPTM 36). The glove box was connected to a second hermetic box (80 L) which contained an aerosol dust counter (Grimm Model 1.108, GmbH & CoKG) with a sample flow rate of 1.2 L min⁻¹. This system included an optical chamber in which particles of different size categories (from 0.3 to 20 µm) were counted. For each hay bale, ten samples of 100 g DM were analysed and hays from each treatment were submitted to 40 dust analyses. Each sample was sealed in a hermetic plastic bag, and further introduced into the glove box. Then, dust free air was flushed through the glove box for about 15 min, until no dust was detectable. The hay sample was then released from the plastic bag using sealed gloves, and mixed for 30 sec. Airborne dust quantification was then carried out for 30 min. Particles were collected on a PolyTetraFluoroEthylene (PTFE) filter (0.2 µm of pore size) for microbiological analysis. Filters were kept at + 4 °C until analysis.

II.2.2.2 Microbiological analysis

Each PTFE filter was divided in 4 pieces and suspended in 5 mL of sterile water containing Tween 80 (0.05 %, w/v). After 30 min of magnetic shaking at 420 rpm, three dilutions of the suspension (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) were made. One mL of each dilution (in triplicate) was deposited in a Petri dish (90 mm diameter) and the culture medium, containing malt extract (1.5 %) / agar (1.5 %) medium (MEA) complemented with chloramphenicol (0.05 %, w/v) was poured over it. The plates were incubated at 25 and 30 °C and the colony forming units (CFUs) of culturable fungi were counted after 3 and 7 days of incubation. Fungal concentration, expressed as the colony forming units per cubic metre of air (CFUs m⁻³), was determined. Colonies were identified after subculturing on MEA. *Aspergilli* and *Penicillia* were cultivated and identified on Czapek yeast autolysate agar (CYA) and 25 % glycerol nitrate agar (G25N) (Pitt, 1979), and *Fusaria* were cultured on potato dextrose agar medium (PDA) (Booth, 1966). The purity of each strain and its identity were checked through macro- and microscopic examinations (Pitt, 1979; Domsch *et al.*, 1980; Von Arx, 1981; Klich, 2002; Samson *et al.*, 2002; Samson *et al.*, 2004). For each treatment, the mycoflora diversity was determined by the Shannon & Weaver index (Shannon & Weaver, 1949).

II.2.2.3. Liquid extraction of dust

A liquid extraction of dust was carried out to determine the pollen concentration and the mineral matter content of dust to estimate the soil contamination of hay. For each hay bale, 100 g was aliquoted and shaken for 30 min with 1.5 L of distilled water.

a. Pollens quantification

Five replicates of 100 µL from the above solution were analysed by mounting microscope slides according to the Wodehouse method with glycerine jelly stained with basic fuchsin (Wodehouse, 1971). Then, microscope slides were examined under a Nikon inverted microscope DIAPHOT-TMD (Nippon Kogaku K.K., Tokyo, Japan). Pollens were counted and identified.

b. Mineral mass of dust and soil contamination

One litre of the above solution was filtered on an ashless filter (90 mm diameter) using a Büchner funnel connected to a flask. The filters were then dried at 100 °C, until a constant mass for dry matter determination, before burning at 550 °C for 48 h in order to determine the ash content. Previous analysis showed that the ash content of plant material was close to 6 % while

the percentage of ash determined from soil samples was about 90 %. The contamination of dust by soil was therefore estimated according to the following expression:

$$\% \text{ soil contamination} = [(\% \text{ ash}-6)*100] / (90-6),$$

Where % ash corresponds to the ash obtained after combustion, and expressed as % of dry mass.

II.2.2.4. Evaluation of mycotoxin contents in hays and dusts

a. Extraction and purification of mycotoxins from hay

The quantification of mycotoxins was adapted from Garon *et al.* (2006). For each bale, 100 g of dry hay DM were randomly selected and homogenized in a blender, and then an aliquot of 5 g was weighed in an Erlenmeyer flask. Mycotoxins were extracted with 100 mL of methanol/water (80:20, v/v) using an Ultra-Turrax basic T25 homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany), then shaken on a rotary shaker for 60 min at 100 rpm and finally centrifuged at 7000 rpm for 15 min (10 °C).

The supernatant (15 mL) obtained from the previous centrifugation was diluted in 90 mL of ultrapure water, acidified with 400 µL of acetic acid and was then purified through an Oasis HLB (6 mL, 200 mg) cartridge (Waters, Milford, MA, USA), previously conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of ultrapure water. The cartridge was washed with 2 mL of ultrapure water. Mycotoxins were eluted with 5 mL of methanol followed by 10 mL of methylterbutyl ether (MTBE)/methanol (90:10, v/v). The eluted mycotoxins were evaporated in a parallel evaporator (Syncore polyvap, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) and finished to dryness under a stream of nitrogen. The final residue was dissolved in 1 mL of a mixture of acetonitrile/water (10:90, v/v) and then filtered through Millex HV 0.45 µm filter before injection into high performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (HPLC-MS).

The analytical recoveries and the quantification limits have been previously described by Séguin *et al.* (In press).

b. Extraction and purification of mycotoxins from dust

Mycotoxins were extracted from dust. Each PTFE filter was divided in 4 pieces and suspended in 10 mL of acetonitrile acidified with acetic acid (5 %, pH 3) then put in an ultrasonic bath for 3 min at a maximum power of 100 and shaken during 10 min at 5 % of maximum power on a rotary shaker (VWR VX-2500 Multi-tube Vortexer). This step was carried out twice. The two supernatants obtained were then evaporated in a parallel evaporator (Syncore polyvap, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) and finished to dryness under a stream of

nitrogen. The final residue was dissolved in 500 μL of a mixture of acetonitrile/water (10:90, v/v) and then filtered through a Millex HV 0.45 μm filter before injection into the HPLC-MS.

For all mycotoxins, the analytical recoveries were above 67 % and the quantification limits were 0.2 ng L^{-1} of air.

c. Multi-mycotoxin detection by HPLC-MS

Liquid chromatography was performed using Agilent Technologies series 1100 (Palo Alto, CA, USA) quaternary pump coupled with an autosampler and an SL model mass spectrometry detector. The analytes were chromatographed at 40 °C on a 150 x 2.1 mm i.d., 5 μm , Zorbax SB-C₁₈ column (Agilent Technologies) with a Securityguard C18 4 x 2 mm cartridge (Phenomenex, Torrance, CA, USA) allowing the separation of 18 mycotoxins (aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂, aflatoxin M₁, alternariol, citrinin, deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, fumagillin, fumonisin B₁, fumonisin B₂, gliotoxin, nivalenol, ochratoxin A, T-2 toxin, verruculogen, zearalenone). Mycotoxins were separated using an elution gradient with acetonitrile (solvent A) and water acidified with 0.5 % acetic acid (pH 3) (solvent B). The gradient program was: at time zero, 5 % solvent A; linear gradient to 15 % solvent A within 3 min; to 30 % solvent A in 11 min; and to 50 % solvent A in 6 min; and finally, to 70 % solvent A in 7 min. The flow rate was 400 $\mu\text{L min}^{-1}$. The sample injection volume was 10 μL .

Mass spectrometry was performed on a quadrupole analyzer equipped with an electron spray ionization (ESI) source and operated in positive and negative modes. The parameters used for the mass spectrometer in all experiments were as follows: capillary voltage, 3.0 kV; solvent gas, 720 L/h; evaporation temperature, 350 °C; pressure of nebulisation, 35 psig.

II.3 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out with the statistical software MINITAB (version 13.20, copyright 2000). Because data did not fit the parametric test conditions, we chose to analyse the effect of treatments by the non-parametric test of Kruskal-Wallis and then the signed rank test (Sokal & Rohlf, 2003).

Table II-1 : Mineral mass, crude fibre and crude protein content in experimentally produced hays.

		Mineral Mass (% of DM)		Crude fiber (g kg ⁻¹ DM)		Crude protein (g kg ⁻¹ DM)	
		Means	(se)	Means	(se)	Means	(se)
Early harvest	Control	6.99 B *	(0.14)	328 B	(11)	93 B	(4) a *
	Haylage	7.96	(0.12)	359	(4)	116	(12) b
	Barn drying	7.40	(0.19)	325	(9)	91	(2) a
	Rainfall after cutting	8.48	(0.65)	359	(9)	89	(4) a
	Lactic bacteria, harvest at 85% DM	7.16	(0.20)	328	(8)	92	(3) ab
	Propionic acid, harvest at 85% DM	7.12	(0.18)	329	(10)	86	(4) a
	Harvest at 75 % DM	7.71	(0.48)	347	(6)	97	(4) ab
	Lactic bacteria, harvest at 75% DM	7.54	(0.29)	344	(13)	89	(10) a
	Propionic Acid, harvest at 75% DM	7.70	(0.09)	339	(6)	88	(5) a
Late harvest	Control	5.98 A	(0.46)	331 B	(18) <i>ab</i>	50 A	(2) <i>a</i> *
	Haylage	6.42	(0.47)	371	(12) <i>b</i>	73	(5) <i>b</i>
	Harvest at 75 % DM	6.31	(0.19)	342	(11) <i>ab</i>	48	(3) <i>a</i>
	Rainfall after cutting	6.63	(0.62)	310	(5) <i>a</i>	45	(3) <i>a</i>
Second crop	Control	7.98 C	(0.07)	249 A	(20.70)	81 B	(8)

* Mean values with different letters are significantly different ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test; $n=4$). Treatments were compared between each harvest (bold letters for the early harvest and italic for the late harvest). Then the 3 controls, early harvest, late harvest and second crop were compared (capital letters).

Table II-2 : Breathable dust content (diameter $< 5 \mu\text{m}$, $n = 40$) in the different experimentally produced hays.

		10 ⁶ particles g ⁻¹ of hay	
		Means	(se)
Early harvest	Control	69 B *	(3) de *
	Haylage	7	(0.4) a
	Barn drying	69	(2) de
	Higher number of tosses	62	(3) cd
	Rainfall before cutting	64	(2) d
	Rainfall after cutting	80	(4) ef
	Lactic bacteria, harvest at 85% DM	55	(2) c
	Propionic acid, harvest at 85% DM	69	(5) cde
	Harvest at 75% DM	87	(5) f
	Lactic bacteria harvest at 75% DM	109	(9) f
	Propionic acid, harvest at 75% DM	47	(2) b
Late harvest	Control	61 AB	(3) <i>b</i> *
	Haylage	13	(1) <i>a</i>
	Late tossing	61	(3) <i>b</i>
	Harvest at 75% DM	64	(1) <i>b</i>
	Rainfall before cutting	79	(4) <i>c</i>
	Rainfall after cutting	68	(3) <i>bc</i>
	Molehill	62	(2) <i>b</i>
Second cut	Control	51 A	(2)

* Mean values with different letters are significantly different ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test). Treatments were compared between each harvest (bold letters for the early harvest and italic for the late harvest). Then the 3 control, early harvest, late harvest and second crop were compared (capital letters).

III. Results

III.1 Nutritive quality

Nutritive quality data are gathered in Table II-1. The comparison between the three harvests (early and late harvests and second crops), on the basis of the control treatment, reveals a significant effect of the harvest date on mineral, crude fibre and crude protein contents (respectively, $F=9.92$, $P<0.01$; $F=23.17$, $P<0.001$; $H=9.85$, $P<0.01$). Hay from the second crop appeared to have the best nutritive value with the highest mineral content and a crude protein content non-significantly different from those of the early harvest hays but higher than the late harvest, with the lowest crude fibre content. A late harvest decreased hay quality, as the control treatment was characterised by a mineral and protein content lower than other control hays and a crude fibre content equivalent to the early harvest control (Table II-1).

Treatment effects among hays of the early harvest were not significant for mineral and crude fibre content, but were significant for crude protein content ($F=3.09$; $P<0.05$). Haylage that was kept at 65 % DM had a higher crude protein content (116 g.kg^{-1} of DM) than hays of most of other treatments.

Among hays of the late harvest, haylage was also distinguished mostly because its crude protein content ($H=9.71$; $P<0.05$) was significantly higher than all other hays.

III.2 Health quality

Breathable dusts of a diameter lower than $5 \mu\text{m}$, which is one of the main factors associated with RAO, represented about 99 % of the total dust. Those two parameters, breathable and total dust, being highly correlated, only breathable dust data is presented (Table II-2).

Breathable dust varied significantly between harvest times (respectively $H=20.65$ and $H=19.77$, $P<0.001$). Hay harvested as a second crop was less contaminated by dust (51×10^6 particles g^{-1} of hay) than hay harvested in the first cut of early harvests (69×10^6 particles g^{-1} of hay) Table II-2.

For each harvest, the applied treatments modified dust content (early harvest: $H=172.27$, $P<0.001$; late harvest: $H=208.06$, $P<0.001$). In the early harvest, haylage was less dusty, with only 7×10^6 particles g^{-1} of hay, than other treatments including the control. The use of lactic bacteria on hay harvested at 85 % DM caused a decrease in dust contamination by about 20 % but induced an increase in dust when hay was harvested at 75 % DM. The propionic acid application was not

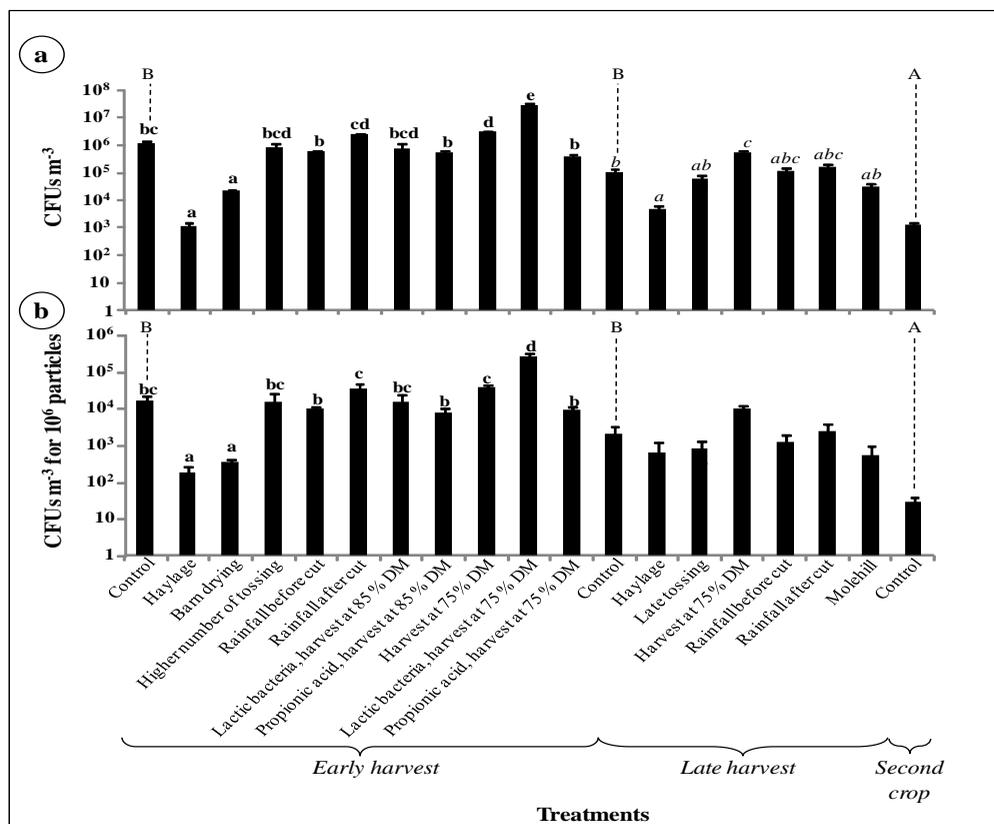


Figure II-2 : Quantity of viable spores estimated from colony forming units per cubic metre (CFUs) after growth at 25°C (a) and quantity of viable spores expressed as 10⁵ particles (b) in the different experimentally produced hay. Data are in the logarithmic scale. Mean values (n=24) with different letters are significantly different (P < 0.05, Kruskal-Wallis test). Treatments were compared between each harvest (bold letters for the early harvest and italics for the late harvest). Then the 3 controls, early harvest, late harvest and second crop were compared (capital letters).

Table II-3 : Mean concentrations of different fungal genera, expressed in CFUs m⁻³, obtained at 25 °C in airborne dust contained in experimentally produced hays (n=24).

		Total Means	Other Means	<i>Absidia</i> Means	<i>Acromonium</i> Means	<i>Alternaria</i> Means	<i>Aspergillus</i> Means	<i>Byssoschlamys</i> Means	<i>Chaetomium</i> Means	<i>Cladosporium</i> Means	<i>Fusarium</i> Means	<i>Mucor</i> Means	<i>Penicillium</i> Means	<i>Rhizomucor</i> Means	<i>Trichoderma</i> Means	<i>Trichothecium</i> Means
Early harvest	Control	1,302,874	95,231	10,127			1,197,515									
	Haylage	1,215	231				868			58			58			
	Barn drying	25,104	4,480	714		46	18,806			93		290	513			150
	Higher number of tosses	908,767	8,714	2,949		156	896,715						3,181			
	Rainfall before cutting	660,104	13,450		1,459		630,541			1,523			13,130			
	Rainfall after cutting	2,800,099	141,418				2,655,764						4,377			
	Lactic bacteria, harvest at 85 % DM	877,715	16,274	755			859,655			1,786						
	Propionic acid, harvest at 85 % DM	575,719	16,043	147	1,423		556,012		147	1,599			1,918			
	Harvest at 75 % DM	3,356,814	28,899	27,465			3,194,824						1,435			
	Lactic bacteria, harvest at 75 % DM	33,476,979	5,875,158	130,282	28,582		27,557,657			14,966			14,966		14,230	
Propionic acid, harvest at 75 % DM	417,121	22,593	9,218	1,642		394,370			158							
Late Harvest	Control	982,197	15,615	3,913		465	707,234		91,146	150			168,052			
	Haylage	4,874	378	13			4,446		13				63			
	Late tossing	69,229	4,542				61,999						2,688			
	Harvest at 75 % DM	632,849	44,225		4,167	1,484	584,592						5,556			
	Rainfall before cutting	124,136	3,739				117,858			287			2,395			
	Rainfall after cutting	174,503	20,544				154,561			1,617			13,669			
	Molehill	34,535	5,707	173	244	47	27,216	14	59	14			1,632	16		
Second Crop	Control	1,390	496	4		58	821	8		15	19		17		18	

efficient when hay was harvested at 85 % DM, but allowed a reduction in dust contamination of about 47 % (Table II-2), when hay was harvested at 75 % DM compared to hay harvested at 75 % DM without a hay preservative. Hays affected by rain after cutting and harvesting at 75 % DM were the most contaminated by dust with, 80 and 87 x 10⁶ particles g⁻¹ of hay, respectively.

Between late harvested hays, a significant difference of breathable dust was also observed (Table II-2) (H=208.06; P<0.001). As for hays harvested precociously, the late harvested haylage was the least dusty with 13 x 10⁶ particles g⁻¹ of hay, while for control, 61 x 10⁶ particles g⁻¹ of hay were measured. At the other extreme the rainfall before cutting treatment was the dustiest with 79 x 10⁶ particles g⁻¹ of hay.

Significant effects of treatments on fungal contamination were observed during early (H=66.20; P<0.001) and late (H=30.98; P<0.001) harvests but also between the controls of different harvests (H=15.60; P<0.001). Indeed, hay harvested in the second crop was less contaminated by mould than control hay harvested during the first cut (Figure II-2a).

Amongst the forage harvested precociously, haylage with 1215 CFUs m⁻³ and hay dried in barn with 25,104 CFUs m⁻³ (Figure II-2a) were the less contaminated by moulds. Harvesting at 75 % DM provoked an increase of about 61 % in mould proliferation compared to control (early and late harvest). Nevertheless, the use of propionic acid on hay harvested at 75 % DM, allowed a reduction in this proliferation by about 88 %. This preservative did not modify fungal contamination when harvested at 85 % DM. As for hays harvested precociously, late harvest haylage was the least mould-contaminated forage with 4,874 CFUs m⁻³ and hay harvested at 75 % DM was the most contaminated by mould with 632,849 CFUs m⁻³.

When expressed on a basis of 10⁶ particles of dust, the second cut also significantly reduced the mould contamination (Figure II-2b) (H=7.48; P<0.05). For early harvests, haylage and hay dried in the barn were the least contaminated with, respectively, 176 and 351 CFUs at 10⁶ particles (Figure II-2b) and for the late harvest, no difference was observed when CFUs were expressed on a 10⁶ particles of dust basis (Figure II-2b). Surprisingly, adding lactic bacteria strongly increased the amount of fungal spores to about 261,193 CFUs at 10⁶ particles), which is about 26 %.

Mycoflora analysis revealed the presence of 50 fungal species distributed in 13 genera (Table II-3). Some colonies were not identified because they did not develop characteristic structures and were then classified as 'Other'. Profiles of fungal contamination appeared to vary between the different periods of cutting but also between treatments of the same harvest. In controls, the proportion of *Aspergillus* decreased with the harvest period and could explain the decrease in total CFUs from the early harvest to the second crop. The *Penicillium* genus appeared

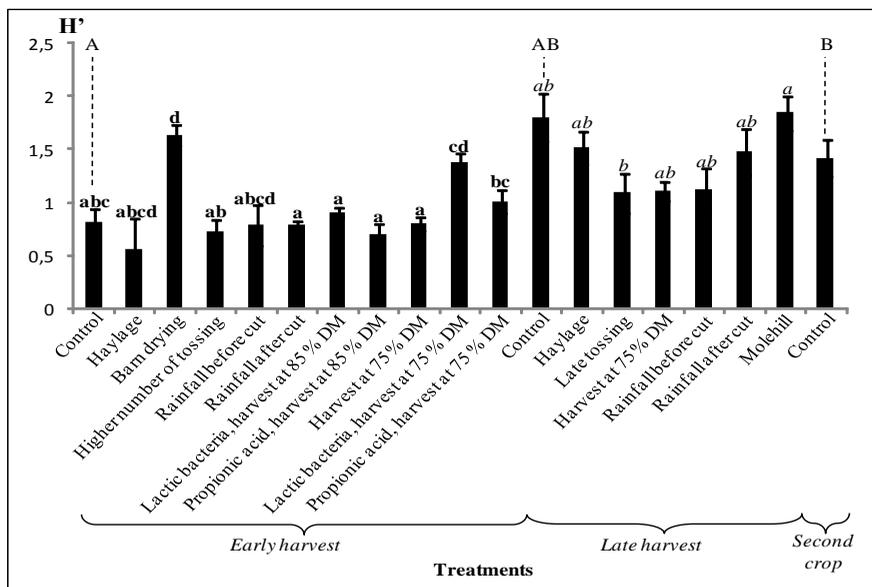


Figure II-3 : Shannon & Weaver H' values estimated for the mycoflora in airborne dust at 25°C in the different experimentally produced hays. Mean values (n=24) with different letters are significantly different (P < 0.05, Kruskal-Wallis and ANOVA). Treatments were compared among each harvest (bold letters for the early harvest and italic for the late harvest). Then the 3 controls, early harvest, late harvest and second crop were compared (capital letters).

Table II-4 : Mean concentrations of *Aspergillus* and *Eurotium* genera in airborne dust, expressed in CFUs m⁻³, cultivated at 25°C from experimentally produced hays (n=24).

		<i>Aspergillus alliaensis</i> Means	<i>A. caespitosus</i> Means	<i>A. candidus</i> Means	<i>A. fumigatus</i> Means	<i>A. parasiticus</i> Means	<i>A. sydowii</i> Means	<i>A. versicolor</i> Means	<i>Eurotium amstelodami</i> Means	<i>E. herbariorum</i> Means	<i>E. repens</i> Means
Early Harvest	Control						1,447	1,447	176,954		1,017,667
	Haylage							463			405
	Barn drying		163		139			163	11,819	12	6,510
	Higher number of tosses					156		3,107	76,884		816,567
	Rainfall before cutting							18,954	132,004	1,523	478,060
	Rainfall after cutting	1,459						58,345	1,121,238		1,474,722
	Lactic bacteria, harvest at 85% DM				2,717				396,262	4,452	456,224
	Propionic acid, harvest at 85% DM		1,447					1,423	102,046		451,096
	Harvest at 75% DM		10,115	4,304				25,934	2,684,411	10,056	460,003
	Lactic bacteria, harvest at 75% DM		217,653					72,010	21,934,741	114,944	5,218,310
Propionic acid, harvest at 75% DM								117,945		276,425	
Late Harvest	Control				159			56,369	308,718		341,988
	Haylage		27					65	2,831		1,524
	Late tossing							603	30,028	11,584	19,785
	Harvest at 75% DM				1,523	7,441		5,880	496,340	3,007	70,401
	Rainfall before cutting	143					143	289	54,102		63,180
	Rainfall after cutting		146					26,908	97,134	146	30,227
	Molehill		95		28	171		509	17,765	313	8,334
Second Crop	Control		4					47	501		269

to develop more during the late harvest in July. *Absidia* (*Mycocladus*) and *Cladosporium* genera were identified in 12 different hays, from 4 CFUs m⁻³ (hay harvested as a second crop) to 130,282 CFUs m⁻³ (hay harvested in June at 75 % DM with lactic bacteria) and from 14 CFUs m⁻³ (hay with molehills) to 14,966 CFUs m⁻³ (hay harvested in June at 75 % DM with lactic bacteria). *Acremonium* and *Alternaria* genera were observed in 6 hays with values varying, respectively, between 244 CFUs m⁻³ (hay with molehills), 28,582 CFUs m⁻³ (hay harvested in June at 75 % DM with lactic bacteria), and 46 CFUs m⁻³ (hay harvested in June and dried in the barn) to 1,484 CFUs m⁻³ (hay harvested in July at 75 % DM). *Chaetomium*, *Byssosclamyces*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Mucor* and *Rhizomucor* genera were precisely identified in some hays. The genus *Fusarium* represented by *Fusarium culmorum* was only observed in hay harvested during the second crop with 19 CFUs m⁻³.

The Shannon & Weaver index was calculated to evaluate fungal diversity. This index varied with the different periods of cutting (H=8.44, P<0.005), with agricultural practices for early harvest hays (H=54.72, P<0.001) and for late harvested hays (H=3.53, P< 0.005) (Figure II-3). Control hay from the early harvest had a lower fungal diversity than control hay harvested from the second cut. The fungal diversity of the late harvest control hay from the first cut was similar to the two other control hays. Among hays harvested early, fungal diversity at 25 °C increased with barn drying. The use of hay preservatives during harvesting at 75 % DM increased the fungal diversity of hays (Figure II-3), compared to hay harvested at 75 % DM without hay preservatives. When harvested in July, treatments had no significant effect on the fungal diversity compared to control.

Among the identified fungi, *Aspergillus* and related genera such as *Eurotium* and *Emericella*, were predominant. These genera represented between 50 and 90 % of total CFUs for all treatments (Table II-3). Ten species were identified, among which *Eurotium amstelodami* and *Eurotium repens* were the most frequently represented (Table II-4) in the different harvests. *Aspergillus versicolor* was observed with values varying from 47 to 72,010 CFUs m⁻³ in all hays but was absent in haylage, hays with a greater number of tosses and harvested at 75 % DM with propionic acid. *Eurotium herbariorum* was observed in 8 hays and was found particularly in hay harvested precociously at 75 % DM with lactic bacteria treatment (114,944 CFUs m⁻³). *Aspergillus fumigatus*, potentially incriminated in RAO, was identified in 5 hays: hays harvested in June with barn drying (139 CFUs m⁻³), hay harvested in June at 85 % DM with lactic bacteria treatment (2,717 CFUs m⁻³), control hay of late harvests (159 CFUs m⁻³), hay harvested in July at 75 % DM (1,523 CFUs m⁻³) and hay with molehills (28 CFUs m⁻³).

Penicillium was the second most frequently represented genus. Nevertheless, the *Penicillium* genus had the highest representation in terms of species, with 21 different species recorded

Table II-5 : Mean concentrations of the *Penicillium* genus in airborne dust, expressed in CFUs m⁻³, cultivated at 25°C from experimentally produced hays (n=24).

		Other <i>Penicillium</i> ‡	<i>P. brevicompactum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>P. coralligerum</i>	<i>P. fellutanum</i>	<i>P. implicatum</i>	<i>P. islandicum</i>	<i>P. piceum</i>	<i>P. roqueforti</i>	<i>P. sublateritium</i>	<i>P. vellutinum</i>	<i>P. verrucosum</i>
	Treatments	Means	Means	Means	Means	Means	Means	Means	Means	Means	Means	Means	Means	Means
Early harvest	Control													
	Haylage								58					
	Barn drying	81	175	140		23				58	23		12	
	Higher number of tosses		2,097	626							146			313
	Rainfall before cutting	5,836			2,918									4,377
	Rainfall after cutting	1,459								2,918				
	Lactic bacteria, harvest at 85 % DM													
	Propionic acid, harvest at 85 % DM									1,618				
	Harvest at 75 % DM							1,435						
	Propionic acid, harvest at 75 % DM									14,966				
Late Harvest	Control	1,447	15,914	2,894					35,552			90,775	21,471	
	Haylage					29			20	13				
	Late tossing							292	733			1,663		
	Harvest at 75 % DM				1,389	4,167								
	Rainfall before cutting		140						575	140		700	840	
	Rainfall after cutting	5,885	146	292		1,021	4,854						1,471	
	Molehill	109	483		156		440	17	253	173				
Second Crop	Control	3					3		7	3				

‡ The group 'Other *Penicillium*' is constituted of *Penicillium* species that were identified in one treatment. These species are : *Penicillium atramentosum*, *P. capsulatum*, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. lividum*, *P. megalosporum*, *P. spinulosum*, *P. viridicatum*.

Table II-6 : Pollens and soil contamination contained in total dust of the different experimentally produced hays, obtained by liquid extraction.

		Pollens (10 ³ g ⁻¹ of hay)	Soil contamination of dust (%)
		Means (se)	Means (se)
Early harvest	Control	35 ^{B*} (6) abc*	37.66 ^B (7.03)
	Haylage	43 (9) abc	32.46 (4.25)
	Barn drying	43 (3) abc	31.55 (5.04)
	Higher number of tossing	32 (4) ab	45.21 (3.28)
	Rainfall before cut	28 (9) ab	20.15 (5.36)
	Rainfall after cut	32 (4) ab	26.58 (6.71)
	Lactic bacteria, harvest at 85% DM	49 (7) bc	39.04 (2.13)
	Propionic acid, harvest at 85% DM	38 (4) abc	40.56 (4.91)
	Harvest at 75% DM	26 (3) a	25.43 (7.81)
	Lactic bacteria harvest at 75% DM	38 (8) abc	26.35 (12.27)
Propionic Acid. harvest at 75% DM	56 (2) bc	43.57 (9.81)	
Late harvest	Control	83 ^C (11)	10.66 ^A (0.58) b*
	Haylage	113 (24)	27.59 (3.77) ^c
	Late tossing	64 (9)	10.20 (1.82) ^b
	Harvest at 75% DM	60 (5)	7.23 (0.34) ^a
	Rainfall before cut	72 (10)	12.68 (1.40) ^b
	Rainfall after cut	59 (13)	13.06 (2.28) ^b
	Molehill	63 (9)	30.64 (6.14) ^c
Second cut	Control	9 ^A (2)	42.49 ^B (2.59)

* Mean values (n=4) with different letters are significantly different (P<0.05, Kruskal-Wallis and ANOVA test). Treatments were confronted among each harvest (bold letters for the early harvest and italic one for the late harvest). Then the 3 controls, early harvest, late harvest and second crop were confronted (capital letters).

(Table II-5). The hays were less contaminated by *Penicillium* during the early harvest than hays harvested in July. Among hays harvested during the early harvest, control hay, hay harvested at 85 % DM with lactic bacteria treatment and hay harvested at 75 % DM with propionic acid treatment were devoid of *Penicillium* genera. For the early harvests, *Penicillium piceum* was predominant, while hays harvested in July and from the second crop were dominated by *Penicillium islandicum*.

Among the 18 mycotoxins sought in hays, zearalenone was the only mycotoxin identified from hays harvested during the first and second cuts. For the early harvest, haylage, hay harvested at 75 % DM and hay harvested at 75 % DM with lactic bacteria were contaminated by zearalenone at 0.314, 1.63 and 0.232 mg kg⁻¹ of hay, respectively. For the late harvest, zearalenone was detected in hay tossed 48 h after cutting (2.381 mg kg⁻¹ of hay), hay affected by rain after cutting (0.26 mg kg⁻¹ of hay) and hay with molehills at a concentration below 25 µg kg⁻¹. In the second cut, zearalenone was detected at concentrations varying from 25 µg kg⁻¹ to 0.765 mg kg⁻¹ of hay.

Zearalenone was also detected in dust from the hay tossed 48 h after cutting, with a low concentration included between the detection and quantification limits, (0.07 and 0.2 ng L⁻¹ of air, respectively).

Pollen contamination varied, depending on the time of the harvest (F= 35.28, P<0.001). The lowest quantity of pollen was detected in hay harvested from the second crop with 9 x10³ pollen grains.g⁻¹ of hay while the highest contamination was determined with 83 x 10³ pollen grains.g⁻¹ of hay in the late harvest control. An effect due to treatments appeared only for the early harvest (F=3.88, P<0.005) (Table II-6). The lowest level of pollen contamination during the early harvest was observed at 75% DM but was significantly different from only two treatments (hay with lactic bacteria treatment harvested at 85 % DM and with propionic acid treatment harvested at 75 % DM).

Evaluation of dust by liquid extraction showed a significant effect of the harvest time on the contribution of soil particles to the dust (Table II-6) (H=8, P<0.05). Hay harvested during the second crop was characterised by a higher soil contamination (42.49 %) and the control hay harvested late had the lowest contamination. The effects of treatment on the soil content in the dust were significant for late harvest hays (H=22.35, P<0.001). Haylage and hay contaminated by molehills, and therefore soil, had the highest soil contamination, while hay harvested at 75 % DM contained the lowest soil contamination.

IV. Discussion

IV.1 Nutritive quality

The nutritive quality criteria of forages depend entirely on the herbivore for which the forage has been produced. Horses have a lower digestive capacity than ruminants but can ingest more dry forage per kg of body weight per day, and extract more nutrients than cattle from all forages (Duncan *et al.*, 1990). Many studies have dealt with the nutritional needs for horses, and tables of registered dietary intake according to use, age and physiological expenditure of horses have been proposed (Martin-Rosset *et al.*, 1990). At pasture, horses are well known for their ability to select their food (Fleurance *et al.* 2005) and then are efficient in ingesting the nutrients they need (Illius & Gordon 1993). In stables, horses are fed with forages that are usually characterised as having a low to medium energy concentration and containing varying levels of fibre and protein (Hill, 2007). Thus, breeders need to provide supplements and concentrated feeds in order to supply horses with energy for work, reproduction, lactation and growth (Hill, 2007).

As expected, we observed that the early cut of the southern French “Crau hay”, with a label of “controlled origin” and recommended for horses, exhibited a high quality and a high protein content. Similarly, the crude protein content of the hay that we produced was higher in the early harvest than in the first cut of the late harvest (Table II-1). However, nutritive value analysis demonstrated that hay harvested in the second cut possessed the best quality, with a lower crude fibre content than hay harvested in the first cut and a crude protein content similar to hay harvested precociously in the first cut. This hay appeared to be more energetic and digestible for horses.

Storage conditions also modified the nutritive quality and especially the crude protein content. Indeed, crude protein content was higher for haylage than dried hays. This result is in accordance with Demarquilly *et al.* (1998) who established that haylage nutritive value is similar or superior to dried hay.

IV.2 Health quality

IV.2.1 Variation of parameters used for its evaluation

All parameters used to evaluate health quality were influenced by treatments. The most sensitive parameters were dust and fungal contaminations and they were often correlated. Indeed,

the dustier hays, for example the hay harvested precociously at 75 % DM, was also the most contaminated by moulds (Table II-2).

Pollen content did not vary much between treatments, and depended mostly on the harvest date. Hay produced from the second cut, when anthesis was finished, was weakly contaminated by pollen (Table II-6).

In the same way, the contamination by soil varied slightly with treatments. Hays harvested late in the first cut were less contaminated by soil than hays of the early harvest and hays of the second cut. The conditions were probably more favourable for the other harvests. Our study also demonstrated that when molehills are not removed, the soil contamination of hay increased (Table II-6), even if no effect on breathable dusts or on fungal contamination was observed. The practice of removing molehills, commonly used by horse breeders, thus appears important.

Health quality was influenced by the time of harvest. In this study, the second cut allowed a reduction in dust and mould concentrations by about 28 % and 99 % respectively, compared to the control harvested precociously as a first cut.

In all hays, the mycoflora were dominated by the genus *Aspergillus* and its related genera which represented more than 50 % of the total CFUs (Table II-3). This result confirms a previous study reported by Séguin *et al.* (In press). Each fungal species is characterised by its own ecological niche, and each hay harvest time as well as the different treatments have created particular ecological conditions that favour particular fungal species. Some differences in the *Aspergillus* genus appeared between early and late harvest; *Aspergillus candidus* was only detected in hay harvested precociously while *A. parasiticus* or *A. sydowii* were only identified in hays harvested from a late harvest. Some species belonging to the *Penicillium* genus were also observed specifically, such as *P. atramentosum* or *P. roqueforti* that were identified in hays harvested precociously. Fungal diversity but not overall contamination was amplified with the use of barn drying or hay preservatives on hay harvested at 75 % DM. Allergenic genera such as *Alternaria* and *Cladosporium* were identified in dust from barn dried hay but not in the control.

Some *Aspergilli* species are supposed to be incriminated in pulmonary diseases such as *A. fumigatus* in equine RAO (Mair & Derksen, 2000; Léguillette, 2003) and *Eurotium amstelodami* in the human pulmonary disease, 'Farmers Lung Disease' (FLD) (Roussel *et al.*, 2005). These 2 fungi are known to produce toxic secondary metabolites (Boudra *et al.*, 2005 ; Slack *et al.*, 2009). Among toxins of *A. fumigatus*, gliotoxin presents immunosuppressive, genotoxic, cytotoxic and apoptotic effects (Waring *et al.*, 1988; Nieminen *et al.*, 2002; Upperman *et al.*, 2003), verruculogen shows tremorogenic and genotoxic effects (Land *et al.*, 1987; Sabater-Vilar *et al.*, 2003), fumagillin appeared cytotoxic and genotoxic (Ingber *et al.*, 1990; Amitani *et al.*, 1995) and helvolic acid has a cytotoxic

effect (Amitani *et al.*, 1995). Fumagillin, gliotoxin and verruculogen were not detected in hays produced in this experiment. Only zearalenone was detected in hay harvested as a second crop, haylage harvested in June, hay harvested in June at 75 % DM with or without lactic bacteria, hay harvested in July and rain affected after cutting, hay tossed 48 h after cutting, and hay contaminated by molehills. Zearalenone has oestrogenic effects on animals and especially pigs (Hagler *et al.*, 2001) but has also shown immunotoxic, hepatotoxic and hematotoxic effects (Zinedine *et al.* 2007). Immune disorders could alter horse performance. One study showed the development of mycotoxicosis in horses exposed to maize contaminated with 2.6 mg kg⁻¹ zearalenone (Gimeno & Quintanilla, 1983). Among the hays in which zearalenone was detected, only hay harvested in the second crop was contaminated by *Fusarium culmorum*, a zearalenone producer (Table II-3). *Fusaria* are ubiquitous in soil and grow on plants in the field (Christensen & Kaufman, 1965). The presence of zearalenone in the hay with molehills could be explained by the telluric origin of these zearalenone producing strains.

Other species identified in dust can also be toxicogenic (*Alternaria alternata*, *P. roqueforti* and *Trichoderma viridae*), allergenic (*A. alternata*, *Cladosporium cladosporioides*) or pathogenic, such as *Absidia (Mycocladius) corymbifera* which is incriminated in FLD (Roussel *et al.* 2005).

IV.2.2 *Effect of environmental conditions*

The decision making processes around hay production are of course of great importance, particularly in areas with abundant rainfall. Producers often need to make a decision between harvesting hay that is too moist (less than 85% DM) or to take the risk of rain after cutting and before harvest. Harvesting at 75 % DM during an early or late harvest resulted in a higher dust content and in mould contamination. This moisture content probably led to an overheating in bales and thus, to dust and mould proliferation. These results are in accordance with a previous study (Séguin *et al.*, In press), and as a consequence, such hays should be avoided for horse feeding.

The impact of unfavourable meteorological conditions on health quality was estimated though the simulation of rainfall before or after cutting. In contrast with the results described by Séguin *et al.* (In press), rainfall after cutting had no detectable effect on contamination by mould (Table II-2). Only rainfall before cutting reduced the health quality of late harvested hays by increasing hay dustiness. The previous study (Séguin *et al.*, In press) was undertaken in 2007, a year characterised by very bad meteorological conditions (strong rainfall in June and July). In this case, hay quality was probably more sensitive to different environmental events than the hay produced

for this study conducted in 2008, in which drier air during the making process may have contributed a reduction in the deleterious effects of simulated rainfalls.

IV.2.3 Improvements to the drying step

Some methods have been developed in order to improve health quality of dry hay and these have been focused mainly on the drying process. Dalphin *et al.* (1991) showed that the use of barn drying reduced the concentration of thermophilic actinomycetes but not mould concentrations. In our study, barn drying improved hay quality by decreasing mould proliferation by about 98 % (Figure II-2), but without an effect on the amount of breathable dust (Table II-2). Using such practices, the mould contamination of breathable dust was similar to barn dry hay and haylage (Figure II-2).

The application of a greater number of tosses is also a practice used to speed up the drying of hay. On one hand, this practice could avoid mould proliferation by providing the best drying conditions, on the other hand, a higher number of tosses increases the loss of dry matter (Vignau-Loustau & Huyghe, 2008), and thus could increase dustiness. These hypotheses were not verified in this work because an increase of the number of tosses did not modify hay quality, either by increasing the dustiness or by decreasing the contamination by moulds.

IV.2.4. Effect of storage processes on health quality

Haylage is increasingly used in equine nutrition in order to reduce equine pulmonary diseases (Billysson, 2002; Holmquist & Müller, 2002; Schwarz *et al.*, 2005). Accordingly, haylages produced in the early and late harvests were the least dusty and contaminated by moulds. These results are in accordance with those of Vandenput *et al.* (1997) and Séguin *et al.* (In press). Thus haylage seems to be an excellent alternative to dry hay because of its low level of dust and mould and a nutritive quality that is similar or superior to dry hay.

The use of preservatives could be a relevant alternative to improve hay quality during the storage process. Different preservatives such as propionic acid and lactic bacteria are commonly used in silage and some methods could be adapted to dry hay. The reduction in the risk of mould contamination during bad harvest conditions through the use of preservatives has been observed previously (Baron & Greer, 1998; Reboux *et al.*, 2002), and was tested in this experiment using hay containing only 75 % DM.

Some authors have shown that the use of preservatives reduced the risk of mould contamination.

Propionic acid reduced dust and mould contamination, by approximately 47% and 86 %, respectively, compared to hay harvested at 75 % DM in June (Figure II-2) and also reduced the concentration of *Eurotium amstelodami* by about 96 % (Table II-4) in accordance with the work undertaken by Reboux *et al.* (2001). The results were not so clear with lactic bacteria. Its application to hay harvested at 75 % DM induced a higher dust and mould contamination. However, the use of lactic bacteria on hay harvested at 85 % DM decreased the dust contamination (Table II-2). These lactic bacteria inoculants are usually used for silage (Holzer *et al.*, 2003), and even if some studies have shown the efficiency of this product on hay (Duchaine *et al.* 1995), the method of application to hay, and more specifically the remaining moisture in the cut forage on which the inoculant is sprayed, must be improved to allow the growth of bacteria and the production of lactic acid to avoid mould proliferation.

V. Conclusion

Even when a good nutritive quality was observed in early harvests, the experimental production of hay in this study has demonstrated that the use of a second cut is better adapted for horses as it leads to good nutritive and health qualities. Health quality is more dependent on agricultural practices and meteorological conditions than nutritive quality. Haylage seems to be a good compromise between nutritive and health values. Other solutions such as the use of barn drying or the application of propionic acid before baling, mostly when enough moisture remains in the hay, seem to be relevant alternatives for improving health quality without an effect on nutritive quality.

Acknowledgements

This work was partly funded through a PhD Grant to V. SEGUIN from the “Conseil Régional de Basse-Normandie” while this project has been approved by the “Pôle de Compétitivité Filière Equine”. The authors would like to acknowledge the staff of the INRA experimental unit of Borculo (P. GEORGET, S. CLOUARD, T. CORBET, M. AUBRY, B. GUIBOUT, J. LEVALLOIS and M. ROUILLON), from Laboratoire Départemental Frank Duncombe (M. HOUSSIN and R. PICQUET) and from UMR INRA EVA (D. BALLOIS, R. SEGURA and A.F. AMELINE) for their kind and skilful support as well as B. de LOYNES D’ESTREE for her efficient help with hay dust analysis. We also acknowledge Biomin Industry for its participation in this study. We would also like to acknowledge Laurence Cantrill for improving the English of the manuscript.

Résultats - CHAPITRE III

"Évaluation des qualités sanitaire et nutritive de foins mono-spécifiques et commerciaux afin de réduire les maladies pulmonaires équinés."

RESULTATS - CHAPITRE III

Evaluation of health and nutritive qualities of single-species and commercial hays in order to reduce equine environmental pulmonary diseases.

Virginie Séguin¹, Servane Lemauviel-Lavenant¹, David Garon², Caroline Lanier², Valérie Bouchart³, Yves Gallard⁴, Benoit Blanchet⁴, Sylvain Diquélou¹, Emmanuelle Personeni¹, Pascal Gauduchon², Alain¹ Ourry

Article soumis le 5 octobre 2009 à Grass and Forage Science

¹ UMR INRA 950 Ecophysiologie végétale, Agronomie et Nutritions N, C, S, IFR 146 ICORE, Esplanade de la Paix, Université de Caen Basse-Normandie, 14032 Caen Cedex, France

² GRECAN EA1772 - IFR 146 ICORE, Université de Caen Basse-Normandie et Centre François Baclesse, Avenue du Général Harris, 14076 Caen Cedex 05, France

³ Laboratoire Départemental Frank Duncombe, Conseil Général du Calvados, 14053 Caen cedex 4, France.

⁴ Unité Expérimentale INRA du Pin, Domaine de Borculo, 61310 Exmes, France.

Key words: breathable dust; Recurrent Airway Disease; endotoxin; grassland; horse feeding; moulds; mycotoxin; single-species hays; multi-species hays

Préambule

Les deux précédentes expérimentations ont permis de valider l'effet de certaines pratiques culturales et conditions météorologiques sur la qualité sanitaire des fourrages et d'identifier plus précisément les facteurs régissant cette qualité.

Au travers de cette troisième expérimentation, il s'agit de valider les deux hypothèses:

- 1) La composition floristique de la prairie conditionne en partie la qualité sanitaire du foin.

Mais aussi de confirmer une nouvelle fois, l'hypothèse suivante :

- 2) Le type de conditionnement du fourrage au cours du stockage (foin versus enrubannage) influence la contamination par les poussières et les champignons, des fourrages.

Pour cela des foins mono-spécifiques d'espèces prairiales typiques de Normandie, *Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, *Alopecurus geniculatus* et *Poa trivialis*, ont été produits puis analysés en termes de qualité sanitaire et nutritive. Puis des foins commercialisés pour l'alimentation équine (2 foins et 2 enrubannés) se différenciant par leurs compositions floristiques, leurs itinéraires techniques ou leurs lieux de production ont été analysés en terme de valeur sanitaire mais également de valeur nutritive. Ces fourrages ont également été comparés à un foin témoin produit en Normandie correspondant au témoin produit lors de la récolte précoce de la seconde année de production expérimentale de foin (Chapitre II).

Ce chapitre a été soumis le 5 octobre 2009 à *Grass and Forage Science*.

Abstract

Recurrent airway obstruction has become a major concern for horse owners. Airborne dust, including aeroallergens from forages, is suspected to be the main factor in its aetiology. As grassland flora are known to modify the nutritive quality of forages, we hypothesised that they could also modify hay dustiness and so health quality. Five single-species hays were compared. Four commercial forages produced for horses as high quality hays and classical hay from Normandy were also compared. The health and the nutritive quality of all forages were evaluated. All health quality parameters (except mycotoxin contents) were highly sensitive to the hay type. The nutritive and health qualities were affected differently for all forages. The comparison of single-species hays revealed that floristic composition modifies both nutritive and health quality, but not in the same way. Three of the four commercial forages examined appeared to have at least an equivalent nutritive value to the classical forage. The Swiss hay had a lower digestibility. From a health quality point of view, the commercial forages appeared better than the classical hay, with lower dust and fungi contamination. It is hypothesised that this was the result of different botanical composition, and potentially different climatic condition during production.

I. Introduction

Forage production for cows, from grassland management to hay making, is now well documented as an objective to improve milk and meat quality (Allen, 1996). In contrast, only few studies have been conducted to improve forage quality for horses, even though horse breeding represents an important economical goal,

The health and performance of horses depend on nutritive quality of forages, mainly described as intake, digestibility and nutrient content (Martin-Rosset *et al.*, 2006). However, horses can spend half of their life in stalls and their health is also closely linked to the hygiene quality of conserved forages (Vandenput *et al.*, 1998). Hay of poor hygiene quality is known to generate pulmonary diseases. Among them, Recurrent Airway Obstruction (RAO), also known as heaves and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), is predominant (Winder, 1987; Hotchkiss *et al.*, 2007). Similar to asthma in human, it is an environmental inflammatory disease characterized by a reversible bronchial constriction with periods of remission, mucus secretion and exercise intolerance (Lowell, 1990). It appears in mature horses exposed to high dust densities (Léguillette, 2003) in hay or in barn environments. RAO has become a major concern of horse owners in the Northern hemisphere including Normandy, a well known area of horse breeding and training. It is considered as the prominent cause of the reduction of performances in race or sport horses (McPherson *et al.*, 1979).

Airborne dusts, including aeroallergens contained in hays and bedding, are suspected to be the major factors in the etiology of RAO (Raymond *et al.*, 1994; Vandenput *et al.*, 1997). Among breathable dust, pollens (Ward & Couëtil, 2005), molds (Clarke and Madelin, 1987; Vandenput *et al.*, 1997), mycotoxins (Wittenberg *et al.*, 1996) and endotoxins (Pirie *et al.*, 2003) are incriminated. Horse breeders have only limited solutions against RAO: (i) to keep horses outside on pasture without hay supplementation; (ii) to reduce airborne dust concentration (when horses are kept in stalls) using low dust foods and bedding material (Wood *et al.*, 1993; Vandenput *et al.*, 1997) such as the use of silage or haylage (Vandenput *et al.*, 1997; Raymonds *et al.*, 1997); (iii) soaking hay (Raymond *et al.*, 1997); (iv) to increase stable ventilation (Sainsbury, 1981). Haylages are increasingly used (Billysson, 2002) as well as high quality forages such as hay produced with alpine mixed seeds (Swiss mixing) and the French Crau hay which has obtained the label of “controlled origin” (in French “Appellation d’Origine Contrôlée”).

Grassland flora is well known to influence hay nutritive quality (Vignau-Lousteau & Huyghe, 2008; Buchin *et al.*, 1999) but it may also influence health quality. *Trifolium repens*, for example, is known to improve forage nutritive value (Dewhurst *et al.*, 2003) mostly by increasing

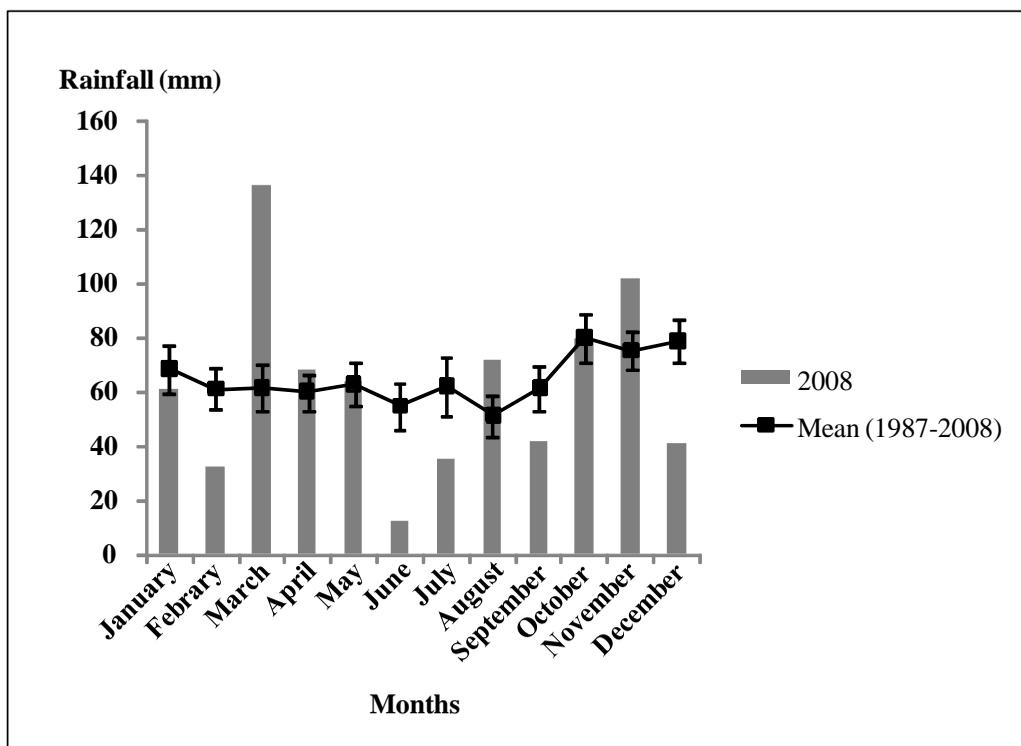


Figure III-1 : Monthly rainfall data during 2008, compared to the average of the last 20 years, obtained from the meteorological data of the INRA experimental unit of Le Pin au Haras.

protein content. The goal in forage production for horses is now to improve health quality by reducing the content of the different airborne dust components while maintaining a good nutritive quality. In this study, health quality (dust, mycoflora, pollens and toxins) and nutritive value (digestibility, energy) have been evaluated by standardised laboratory methods for different conserved forages. A previous study (Séguin *et al.*, In press) examined the effect of agricultural practices and meteorological conditions on health quality of forages, but not of floristic composition. The objectives were, thus, (i) to identify the effect of the floristic composition of grasslands on hay quality comparing single-species hays of typical species of grasslands from Normandy (*Trifolium repens*, *Lolium perenne*, *Alopecurus geniculatus*, *Poa trivialis*, *Holcus lanatus*); (ii) to compare the quality of commercial forages integrating single-species haylage, multi-species haylage, the Crau hay, hay from Swiss mixing produced for horses as high quality hay and a classical hay produced experimentally; (iii) to establish if health and nutritive qualities can be improved together.

II. Materials and Methods

II.1 Experimental design

II.1.2 Experimental production of single-species and classical hays

Single-species and classical hays were harvested on the same permanent grassland located in the INRA experimental unit of Pin-au-Haras (Normandy, France, 48°77N, 0°13'W, 205 m). The climate is temperate with an average annual temperature of 10 °C and an average annual rainfall of 780 mm. During summer 2008, the conditions of hay harvest were favourable because in May and June, rainfalls were below the mean of these 20 last years (Figure III-1).

This grassland of 4.96 ha was chosen for this study because its flora is typical of Normandy grasslands. *Poa trivialis*, *Alopecurus geniculatus*, *Holcus lanatus*, *Ranunculus repens*, *Trifolium repens* and *Lolium perenne* are the main species with Braun-Blanquet coefficients of 5, 4, 3, 3, 2 and 2 respectively (Braun-Blanquet, 1964). For many years this grassland has been subjected to: a lime application (1.6 t ha⁻¹) every 4 years; alternately with an organic fertilisation (16 to 18 t ha⁻¹ applied as manure) every 2 years; 3 annual (spring, after the first and the second cut) applications of N fertilizer for a total of 150-180 kg N ha⁻¹; an annual chemical treatment of weeds; and the destruction of molehills.

II.1.2.1 Single-species hays

Five species were chosen for the production of single-species hays because of their dominance in Normandy's grasslands. Among them four are grasses (*Lolium perenne*, *Alopecurus geniculatus*, *Poa trivialis*, *Holcus lanatus*) and the last is a legume (*Trifolium repens*). For each species, individual plants were cut at 5 cm in May, 26th 2008 and 3 replicates of 1.5 kg of fresh mass were harvested. They were tossed once a day in field and then harvested at 85 % of dry matter (DM). These different hays were conserved in loose in perforated bag until analysis. Their dry mater content when analysed was about 90 %.

II.1.2.2 Classical hay

A multi-species hay from our experimental grassland was harvested in June, 10th 2008 on a sub-plot of 600 m². After a cut at 5 cm, hay was daily tossed until harvest and baled at 85 % of dry matter in low-density square bales (116 kg m⁻³ in average). Then, this sub-plot was sampled by collecting randomly six hay bales that were used for further analysis. These hay bales (classical hay) were used to compare conventional hay produced in Normandy with high quality commercial hays specifically produced for horses. In this study, this classical hay will correspond to 'control'.

II.1.3 Commercial forages

Four commercial forages were chosen because of their frequent use in equine nutrition. Two forages are haylages, the first one "Haylage Gr" ("*Chevalhage*", La Garenne, Langonnet, 56 630 Bretagne, France, www.haylage.biz) was harvested from a grassland seeded with four grasses: *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Festuca rubra* and *Poa pratensis*, and had a dry mater content of 72 % DM, while the second "Haylage Lm" ("*ECOLIT*", Haras de la Chapelle, 14370 Croissanville, France, www.ecolit.com) contained exclusively *Lolium multiflorum* and had a dry matter content of 52 % DM. The two other forages are dry hays. The Crau hay is considered a high quality hay which has obtained the French quality label of "Controlled Origin". Its floristic composition integrates *Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Festuca pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Lotus corniculatus*, *Medicago spp.*, *Vicia cracca*. Its dry matter content was 90 % DM. The last hay was produced on grassland located in the INRA experimental unit of Pin-au-Haras sowed with a commercial Swiss seed mix, the floristic composition being characteristic of alpine grasslands: *Alopecurus geniculatus*, *Festuca pratensis*, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Poa trivialis*, *Rumex obtusifolius*, *Taraxacum officinale* and *Ranunculus repens*. Its dry matter content was about 84 % DM.

II.2 Hay quality measurements

Three hay bales for single-species hays and four hay bales for commercial hays were analysed. For each hay bale, dry and mineral matter content and hay density were measured. Then, nutritive and health qualities were assessed.

II.2.1 Nutritive quality

Nutritive quality was evaluated by crude fibre and crude protein quantification. These parameters correspond, respectively, to cellulosic content in cell wall and the nitrogenous constituents of forage. For each hay, an aliquot of 100 g of hay was dried at 100°C during 24 h to a constant mass. Mineral content was determined by incineration during 5 h at 550 °C of 5 g of dried hay at 100 °C (ISO 5984, 2002). The concentration of crude protein (CP) was determined by the Kjeldahl method (Bradstreet, 1965) to evaluate the nutritive value. The concentration of crude fibre (CF) was determined by the Weende method (Naumann & Bassler, 1988) to evaluate digestibility. For commercial forages, the 4 replicates were analysed but for single-species hays, only one sample consisting of a mix of the 3 replicates, was analysed.

II.2.2 Health quality

II.2.2.1 Quantification of breathable dust

The quantification of breathable dust was adapted from Vandenput *et al.* (1997) and standardised after preliminary trials to reduce variability of measurements. An hermetic glove box (200 L) was connected to a gas compressor allowing a constant air flow (200 L min⁻¹), after previous removal of environmental dusts using a disposal filter capsule glass microfiber media with polypropylene housing (600 cm², Whatman HEPA-CAP™ 36). The glove box was connected to a second hermetic box (80 L) which contained an aerosol dust counter (Grimm Model 1.108, GmbH and CoKG) with a sample flow rate of 1.2 L min⁻¹. This system includes an optical chamber in which particles of different size categories (from 0.3 to 20 µm) are counted. For each hay bale, ten samples of 100 g DM were analysed. Each sample was sealed in a hermetic plastic bag, and further introduced into the glove box. Then, dust-free air was flushed during about 15 min, until no dust was detectable. Each hay sample was then released from the plastic bag using sealed gloves, and mixed for 30 seconds. Airborne dust was then measured for 30 minutes. Particles were collected on one PolyTetraFluoroEthylene (PTFE) filter (0.2µm of pore size) for microbiological analysis. Filters were kept at +4°C, until analysis.

II.2.2.2 Microbiological analysis

Each PTFE filter obtained previously, was divided in 4 pieces and suspended in 5 mL of sterile water containing Tween 80 (0.05 %, w/v). After 30 minutes of magnetic shaking at 420 rpm, three dilutions of the suspension (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) were prepared. One mL of each dilution (triplicate) was deposited in a Petri dish (90 mm diameter) and the medium constituted by malt extract (1.5 %) / agar (1.5 %) medium (MEA) complemented with chloramphenicol (0.05 %, w/v) was poured over it following the soil plates method of Warcup (1950). The plates were incubated at 25 and 30 °C and the colony forming units (CFUs) of culturable fungi were counted after 3 and 7 days of incubation. The colonies were identified after subculturing on MEA. *Aspergilli* and *Penicillia* were cultured and identified on Czapek yeast autolysate agar (CYA) and 25 % glycerol nitrate agar (G25N) (Pitt, 1979), and *Fusaria* on potato dextrose agar medium (PDA) (Booth, 1966). The purity of each strain and its identity were checked through macro- and microscopic examinations (Pitt, 1979; Von Arx, 1981; Klich, 2002; Samson *et al.*, 2002; Samson *et al.*, 2004). For each treatment, the mycoflora diversity was determined by the Shannon & Weaver index (Shannon & Weaver, 1949).

II.2.2.3 Evaluation of mycotoxin contents in hays

The quantification of mycotoxins was adapted from the method developed by Garon *et al.* (2006) and used for corn silage.

For each bale, 100 g of hay DM were randomly selected and homogenized in a blender, then an aliquot of 5 g was weighed in an Erlenmeyer flask. Mycotoxins were extracted with 100 mL of a mixture of methanol/water (80:20, v/v) using an Ultra-Turrax basic T25 homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany), then shaken on a rotary shaker for 60 min at 100 rpm and finally centrifuged at 7000 rpm for 15 min (10 °C).

A volume of 15 mL of the supernatant obtained from the previous centrifugation was diluted in 90 mL of Milli-Q water, acidified with 400 µL of acetic acid and was then purified through Oasis HLB (6 mL, 200 mg) cartridge (Waters, Milford, MA, USA), previously conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of Milli-Q water. The cartridge was washed with 2 mL of Milli-Q water. Mycotoxins were eluted with 5 mL of methanol followed with 10 mL of methylterbutyl ether (MTBE)/methanol (90:10, v/v). The eluted mycotoxins were evaporated in a parallel evaporator (Syncore polyvap, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) and finished to dryness under a stream of nitrogen. The final residue was dissolved in 1 mL of a mixture of acetonitrile/water (10:90, v/v) and then filtered through Millex HV 0.45 µm before injection into HPLC-MS.

Liquid chromatography was performed using Agilent Technologies series 1100 (Palo Alto, CA, USA) quaternary pump coupled with an autosampler and a SL model mass spectrometry detector. The analytes were chromatographed at 40 °C on a 150 x 2.1 mm i.d., 5 µm, Zorbax SB-C₁₈ column (Agilent Technologies) with a Securityguard cartridge C18 4 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) allowing the detection and quantification of 15 mycotoxins (aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂, alternariol, citrinin, diacetoxyscirpenol, fumagillin, fumonisin B₁, fumonisin B₂, gliotoxin, ochratoxin A, T-2 toxin, verruculogen, zearalenone). Mycotoxins were separated using an elution gradient with acetonitrile (solvent A) and water acidified with 0.5 % acetic acid (pH 3) (solvent B). The gradient program was: at time zero, 5 % solvent A; linear gradient to 15% solvent A within 3 min; to 30 % solvent A in 11 min; and to 50% solvent A in 6 min; and finally, to 70 % solvent A in 7 min. The flow rate was 400 µL min⁻¹. The sample injection volume was 10 µL.

Mass spectrometry was performed on a quadrupole analyzer equipped with electron spray ionization (ESI) source and operating in positive and negative modes. The parameters used for the mass spectrometer in all experiments were as follow: capillary voltage, 3.0 kV; solvent gas, 720 L/h; evaporation temperature, 350 °C; pressure of nebulisation, 35 psig. The ions monitored, the analytical recoveries and the quantification limits correspond to those used in Séguin *et al.* (In press).

II.2.2.4 Liquid extraction of dust

A liquid extraction of dust was carried out to determine the pollen and endotoxin concentrations. For each hay bale, 100 g was aliquoted and shaken for 30 min with 1.5 L of distilled water. Only commercial hays were the subject of the following analyses.

a. Pollens quantification

Five replicates of 100 µL from the above solution were analysed by mounting microscope slides according to the Wodehouse method with glycerine jelly stained with basic fuchsin (Wodehouse, 1971). Then, microscope slides were examined under a Nikon inverted microscope DIAPHOT-TMD (Nippon Kogaku K.K., Tokyo, Japan) and pollens were counted.

b. Extraction and quantification of endotoxins

Endotoxin concentration was evaluated by the semi-quantitative method of gel-clot LAL (*Limulus* Amebocyte Lysate) based on the reaction between LAL and endotoxins (Levin & Bang, 1968). 0.1 mL of the above solution used at three dilution levels (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) were added to

Table III-1 : Crude fiber and crude protein quantifications in a) single-species hays and b) control hay and commercial forages. Mean values with different letters are significantly different ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test; $n=4$).

	Crude Fiber g kg ⁻¹ MS	Crude Protein g kg ⁻¹ MS
<i>a- Single-species hays</i>		
<i>Trifolium repens</i>	223	214
<i>Lolium perenne</i>	345	84
<i>Alopecurus geniculatus</i>	436	68
<i>Poa trivialis</i>	370	113
<i>Holcus lanatus</i>	369	82
<i>b- Grass forages</i>		
Control	328 ab	93 ab
Haylage Gr	360 bc	86 ab
Haylage Lm	315 a	159 c
Crau hay	322 ab	105 b
Swiss hay	372 c	82 a

0.1mL of Endosafe[®] LAL reagent (U.S. Licence No. 1197, Charles Rivers Laboratories). Tubes were incubated at 37°C for 60 min and the reaction was then stopped at 180°C. Analyses of a negative control (with apyrogen water) and a positive control (standard solution of endotoxins) were also performed. Endotoxin concentration was estimated by multiplying the LAL labelled sensitivity (0.125 Endotoxin units (EU) ml⁻¹ for this study) by the reciprocal of the dilution coefficient. The results (R) of the endotoxins analyses were categorised as follows : Grade I : 1.875 EU g⁻¹ of hay < R ≤ 1.875 x 10¹ EU g⁻¹ of hay, Grade II : 1.875 x 10¹ EU g⁻¹ of hay < R ≤ 1.875 x 10² EU g⁻¹ of hay, Grade III : 1.875 x 10² EU g⁻¹ of hay < R ≤ 1.875 x 10³ EU g⁻¹ of hay, Grade IV : 1.875 x 10³ EU g⁻¹ of hay < R ≤ 1.875 x 10⁴ EU g⁻¹ of hay and Grade V : 1.875 x 10⁴ EU g⁻¹ of hay < R .

II.3 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out with the statistical software MINITAB (version 13.20, copyright 2000). Because data didn't fit the parametric test conditions, we chose to use the non-parametric test of Kruskal-Wallis and then the signed rank test (Sokal & Rohlf, 2003).

III. Results

III.1 Evaluation of nutritive quality

III.1.1 Single-species experimental hays

Nutritive value data measured on the single-species hays are presented in Table III-1a. Nutritive value of *Trifolium repens* hay distinguished from the *Poaceae* by the lower CF concentration (222 g kg⁻¹ DM). Nevertheless, its Crude Protein (CP) concentration and its mineral content (data not shown) were the highest. *Trifolium repens* seems to have a good nutritive value with its high nitrogen content and to be more digestible with its low cellulosic content.

Among the *Poaceae*, disparities are also observed. *Alopecurus geniculatus* hay was the least digestible with the highest CF concentration and the lowest CP concentration compared to other *Poaceae* with, respectively, 436 and 68 g kg⁻¹ DM (Table III-1a). Among *Poaceae*, *Poa trivialis* had the highest CP content with 113 g kg⁻¹ DM.

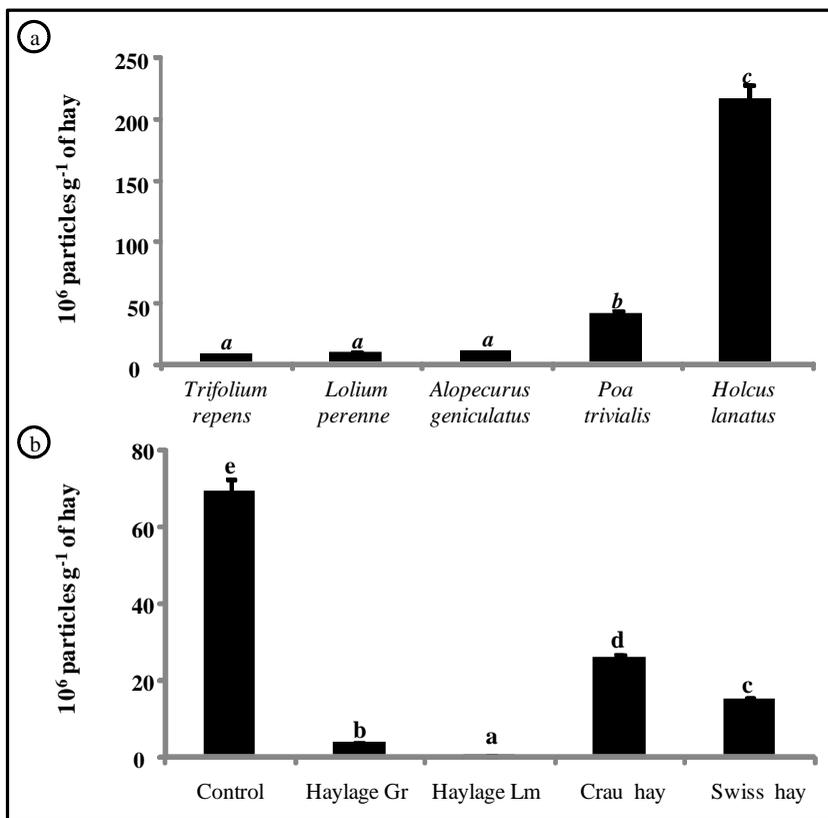


Figure III-2 : Breathable dust content (diameter <math><5\mu\text{m}</math>) in a) single-species hays and b) control hay and commercial forages. Mean values with different letters are significantly different ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test; $n=12$).

Table III-2 : Mean concentrations of viable spores estimated from colony forming units per cubic meter ($10^3 \text{ CFU}/\text{m}^3$) after growth at 25°C and for 10^6 particles, in a) single-species hays and b) control hay and commercial forages. Mean values with different letters are significantly different ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test; $n=6$ for single-species hays; $n=8$ for commercial forages and control hays).

	10^3 CFU m^{-3}		CFU for 10^6 particles	
	means	se	means	se
<i>a- Single-species hays</i>				
<i>Trifolium repens</i>	165 ^b	27	22846 ^c	7121
<i>Lolium perenne</i>	361 ^b	180	32964 ^c	13068
<i>Alopecurus geniculatus</i>	390 ^b	169	49143 ^{bc}	37846
<i>Poa trivialis</i>	228 ^b	105	5015 ^b	3537
<i>Holcus lanatus</i>	33 ^a	7	149 ^a	37
<i>b- Grass forages</i>				
Control	1303 ^b	356	17707 ^a	9710
Haylage Gr	5 ^a	1	1285 ^a	288
Haylage Lm	75 ^b	27	874252 ^b	457755
Crau hay	1 ^a	0.3	61 ^a	18
Swiss hay	1 ^a	0.3	99 ^a	37

III.1.2 Commercial forages

Nutritive values for the commercial hays are presented in Table III-1b. Nutritive quality is significantly different among commercial forage (Mineral mass: $F=18.62$; $p<0.001$; CF concentration: $F=7.86$; $p<0.005$; CP concentration: $H=13.50$; $p<0.01$).

Nutritive values of haylages were equivalent or superior to dry hays. Haylage Gr was not different from Control, Swiss and Crau hays for CF and CP parameters while Haylage Lm was superior to Haylage Gr and Swiss and Crau hays for CP concentration ($159 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$) and equivalent to Control and Crau hays for CF concentration. Haylage Gr which was composed of 4 *Poaceae*, had a lower CP content ($86 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$) and digestibility with $360 \text{ g CF kg}^{-1} \text{ DM}$ than Haylage Lm, composed only of *Lolium multiflorum* with, respectively, $159 \text{ g CP kg}^{-1} \text{ DM}$ and $315 \text{ g CF kg}^{-1} \text{ DM}$.

Among Control, Swiss and Crau hays, the higher CF concentration was determined in Swiss hay ($372 \text{ g CF kg}^{-1} \text{ DM}$) and the higher CP concentration ($105 \text{ g CP kg}^{-1} \text{ DM}$) was determined in Crau hay. The lowest CF and the highest CP concentration were found for the Crau hay. This can be due to the higher extent of the proportion of Legume species in the Crau hay.

According to these results, it seems that floristic composition modulates the nutritive value.

III.2 Evaluation of health quality

III.2.1 Single-species experimental hays

Breathable dust quantity in single-species hays varied significantly with species ($H=48.32$, $p<0.001$) (Figure III-2a). The highest concentration of breathable dust was measured for *Holcus lanatus* hay with 215.9×10^6 particles g^{-1} of hay while at the opposite, the lowest concentrations were obtained for *Trifolium repens* hay (7.13×10^6 particles g^{-1} hay), *Lolium perenne* hay (8.35×10^6 particles g^{-1} of hay) and *Alopecurus geniculatus* hay (9.22×10^6 particles g^{-1} of hay) (Figure III-2a). An intermediate value was obtained in *Poa trivialis* hay with 40.25×10^6 particles g^{-1} of hay.

Species ranging was different concerning fungal contamination (Table III-2a). *Holcus lanatus* hay, with 33×10^3 CFUs m^{-3} , had a significantly lower value than *Lolium perenne* hay (361×10^3 CFUs m^{-3}), *Trifolium repens* (165×10^3 CFUs m^{-3}) and *Poa trivialis* (228×10^3 CFUs m^{-3}) ($p<0.05$) (Table III-2a). Therefore, *Holcus lanatus* hay was the most dusty but the least contaminated by fungal spores. When expressed on a 10^6 particles of dust basis ($H=10,40$; $p<0,05$), it had 149 CFUs for 10^6 particles of dust, while, for example, *Alopecurus geniculatus* hay had 49143 CFUs for 10^6 particles of dust (Table III-2a).

Table III-3 : Mean concentrations of different fungal genera obtained at 25 °C in airborne dust contained in single-species hays (n=18) and control hay and commercial forages (n=24).

Mold species	Single-species hays									Grass forages											
	<i>Trifolium repens</i>		<i>Lolium perenne</i>		<i>Alopecurus geniculatus</i>		<i>Poa trivialis</i>		<i>Holcus lanatus</i>		Control		Haylage Gr		Haylage Lm		Crau hay		Swiss hay		
	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	
Total	164653	27416	361440	179798	389800	168985	227649	104688	32600	7198	1302874	356253	4855	1136	75447	26677	1444	292	1416	345	
Others	48249	8975	103799	42835	251112	71583	35745	8875	4630	1872	95231	37597	403	120	10833	4301	279	147	303	92	
<i>Absidia</i>					586	414	3181	2408			10127	6217			91	100				152	80
<i>Acremonium</i>			6710	4736			433	446	386	397			35	38						22	24
<i>Alternaria</i>	351	361			293	302									91	100	64	39	65	39	
<i>Aspergillus</i>	103947	20638	210859	68028	135259	35728	142527	48507	22569	3886	1197515	195181	1977	503	33172	15901	548	193	630	360	
<i>Chaetomium</i>							223	229	193	198			88	76			87	44	22	24	
<i>Cladosporium</i>	2455	1191	5468	3927	569	402	2727	2052	1157	894			35	38			22	24	89	98	
<i>Doratomyces</i>							210	217													
<i>Penicillium</i>	9334	3087	34283	21386	1688	1029	42603	22204	3472	1809			2223	659	31189	8762	444	162	89	58	
<i>Rhizomucor</i>	317	326			293	302														22	24
<i>Rhizopus</i>															69	76					
<i>Scopulariopsis</i>			322	331					193	198			95	57							
<i>Stachybotrys</i>																				22	24

Table III-4 : Mean concentrations of *Aspergillus* and *Eurotium* genera obtained at 25 °C in airborne dust contained in single-species hays (n=18) and control hay and commercial forages (n=24).

Aspergillus species	Single-species hays									Grass forages										
	<i>Trifolium repens</i>		<i>Lolium perenne</i>		<i>Alopecurus geniculatus</i>		<i>Poa trivialis</i>		<i>Holcus lanatus</i>		Control		Haylage Gr		Haylage Lm		Crau hay		Swiss hay	
	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se
Total of <i>Aspergillus</i>	103947	20638	210859	68028	135259	35728	142527	48507	22569	3886	1197515	195181	1977	503	33172	15901	548	193	630	360
<i>Aspergillus caespitosus</i>	2220	966	9419	6815	8216	3331	1684	1732	193	198			30	33						
<i>Aspergillus fumigatus</i>					558	394	1732	1000	193	198			28	31			21	23	454	226
<i>Aspergillus sydowii</i>											1447	1478								
<i>Aspergillus terreus</i>					586	603														
<i>Aspergillus versicolor</i>	11673	2781	11075	5531	847	871	11784	5242	1350	512	1447	1478	28	31	3410	2310	43	33	22	24
<i>Eurotium amstelodami</i>	44843	10004	100768	33758	48954	8832	29314	7944	9838	1363	176954	28884	1082	200	19071	7599	295	82	88	56
<i>Eurotium herbariorum</i>	367	378	322	331			421	433					29	32	10291	5766				
<i>Eurotium repens</i>	44844	6510	89276	21593	76098	21696	97592	32157	10995	1615	1017667	163341	780	177	399	226	188	56	66	53

Table III-5 : Mean concentrations of *Penicillium* genus obtained at 25 °C in airborne dust contained in single-species hays (n=18) and control hay and commercial forages (n=24).

Mold species	Single-species hays									Grass forages										
	<i>Trifolium repens</i>		<i>Lolium perenne</i>		<i>Alopecurus geniculatus</i>		<i>Poa trivialis</i>		<i>Holcus lanatus</i>		Control		Haylage Gr		Haylage Lm		Crau hay		Swiss hay	
	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se	Means	se
Total of <i>Penicillium</i>	9334	3087	34283	21386	1688	1029	42603	22204	3472	1809			2223	659	31189	8762	444	162	89	58
<i>Penicillium brevicompactum</i>	8984	2726	34283	21386			40134	20293	2508	1148										
<i>Penicillium implicatum</i>																			21	23
<i>Penicillium islandicum</i>													30	33						
<i>Penicillium lividum</i>																			21	23
<i>Penicillium piceum</i>					1688	1029	2468	1911	772	462			429	120	457	323	276	67	89	58
<i>Penicillium roqueforti</i>	351	361											1764	506	30134	7783	126	50		
<i>Penicillium variabile</i>									193	198										
<i>Penicillium verruculosum</i>															599	656				

The identification of mycoflora revealed the presence of 22 fungal species distributed in 10 genera, in single-species hays (Table III-3). Some colonies were not identified because they didn't develop reproductive structures, they were then classified as 'Other'. Shannon and Weaver values, calculated to evaluate fungal diversity, showed no significant difference between single-species hays ($F=1,07$; $p>0,05$). Single-species hays were dominated by 2 genera, *Aspergillus* and *Penicillium* except *Alopecurus geniculatus* hay for which *Aspergillus* was the only dominant genus.

Others genera (Table III-3) that can be toxinogenic and/or allergenic, were found in single-species hays such as *Alternaria* in *Trifolium repens* and *Alopecurus geniculatus* hays, *Scopulariopsis* in *Lolium perenne* and *Holcus lanatus* hays, *Acremonium* in *Lolium perenne*, *Poa trivialis* and *Holcus lanatus* hays, *Chaetomium* in *Poa trivialis* and *Holcus lanatus* hays and *Rhizomucor* in *Trifolium repens* and *Alopecurus geniculatus* hays.

Aspergillus was the main fungal genus and represented at least 35% (*Alopecurus geniculatus*) to 70% (*Holcus lanatus*) of total CFUs m^{-3} (Table III-3). Among *Aspergillus* and related genus such as *Eurotium* (sexual state of *Aspergillus* genus), 7 different species were identified in the single-species hays. *Eurotium repens* and *E. amstelodami* were the 2 species most represented in dust contained in hays (Table III-4). The higher concentrations of *E. repens* were found in *Poa trivialis* with $97.59 \cdot 10^3$ CFUs m^{-3} and in *Lolium perenne* with about $89.27 \cdot 10^3$ CFUs m^{-3} for *E. amstelodami*. *Aspergillus versicolor* and *A. caespitosus* were found also in all single-species hays. *A. fumigatus* was found in 3 hays: *Alopecurus geniculatus* hay (558 CFUs m^{-3}), *Holcus lanatus* hay (193 CFUs m^{-3}) and *Poa trivialis* hay ($1.7 \cdot 10^3$ CFUs m^{-3}). *A. terreus* was also found in *Alopecurus geniculatus* hay. *E. herbariorum* was only found in *Lolium perenne*, *Poa trivialis* and *Trifolium repens* hays.

Penicillium was the second dominant genus. Four species were identified (Table III-5). *P. brevicompactum* was identified in all hays except in *Alopecurus geniculatus* hay, *P. piceum* in *Alopecurus geniculatus*, *Poa trivialis* and *Holcus lanatus* hays. *P. roqueforti* and *P. variable* were respectively identified in *Trifolium repens* hay and *Holcus lanatus* hay (Table III-5).

The 15 mycotoxins analysed were not detected in any of the different single-species hays.

These first results showed that floristic composition influences the health quality. The level of dust and fungal contamination varied significantly with the plant species. Despite of the high dust contamination, *Holcus lanatus* had the lowest fungal contamination. *Alopecurus* matrix, selects a particular mycoflora with very few *Penicillium*.

III.2.2 Commercial forages

The commercial forages were significantly differentiated by breathable dust content ($H=181.31$; $p<0.001$) (Figures III-2b). Forages produced for horse feeding contained significantly less dust than control hay. Haylage Lm, the more humid (52 % DM) was the less dusty with 0.08×10^6 particles g^{-1} of hay followed by Haylage Gr with 3.48×10^6 particles g^{-1} of hay. The Swiss and Crau hays were intermediate with, respectively 14.79×10^6 and 25.44×10^6 particles g^{-1} of hay and the Control hay was the dustier with 69.24×10^6 particles g^{-1} of hay (Figure III-2b).

Fungal contamination (Table III-2) was, also, significantly modified by the hay type ($H=32.19$; $p<0.001$). Haylage Lm, the least dusty, was the most contaminated with 75×10^3 CFUs m^{-3} among the commercial hays. Nevertheless, it was much less contaminated than control hay with 1303×10^3 CFUs m^{-3} . There was negligible contamination in Haylage Gr, Crau and Swiss hays. When expressed on the basis of CFU for 10^6 particles of dust, Crau hay, Swiss hay and the Haylage Gr were the least contaminated, Control hay had medium contamination, and Haylage Lm, the most contamination with 874252 CFUs for 10^6 particles of dust (Table III-2) ($H=16.81$; $p<0,005$), showing in the latter than about 87 % of breathable dust were fungal spores.

The identification of mycoflora revealed 23 fungal species distributed in 11 genera in commercial forages and control hay (Table III-3). No difference in Shannon and Weaver values was significant between hays ($F=2.43$; $p>0.05$). Nevertheless, commercial hays appeared to have a profile of fungal contamination very different in terms of genera but also of species.

Among these 11 genera, *Aspergillus* and *Penicillium* genera were again the most important and represented about 80% of total viable spores in airborne dust of 3 commercial hays: Haylage Gr, Haylage Lm and Crau hay. Fewer *Penicillium* spores were found in the Swiss and control hays (Table III-3). The Swiss hay had a wider range of genera than the other hays.

Among the others genera found in commercial hays, *Cladosporium* and *Chaetomium* were identified in haylage Gr, Crau hay and Swiss hay with 22 to 89 CFUs m^{-3} and 22 to 88 CFUs m^{-3} respectively (Table III-3). *Alternaria* was identified in haylage Lm, Crau hay and Swiss hay with 64 to 91 CFUs m^{-3} . *Absidia* (*Mycocladus*) was identified in Control, Crau and Swiss hays (Table III-3) and *Acremonium* in haylage Gr and Swiss hay. *Scopulariopsis* was only identified in haylage Gr, *Rhizopus* in haylage Lm, *Rhizomucor* and *Stachybotrys* in Swiss hay.

Among *Aspergillus* genus and related genera (*Emericella*, *Eurotium*), 7 different species were identified (Table III-4): *Aspergillus caespitosus*, *A. fumigatus*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, *Eurotium amstelodami*, *E. herbariorum* and *E. repens*. *E. amstelodami* was the main *Aspergillus* species for Haylage Gr and Lm and Crau hay with 1082 CFUs m^{-3} , 19071 CFUs m^{-3} and 295 CFUs m^{-3} , respectively. For Swiss hay, the main species was *A. fumigatus* with 454 CFUs m^{-3} and for control hay, it was *E.*



Figure III-3 : Endotoxin concentrations contained in grass forages expressed in Grade.

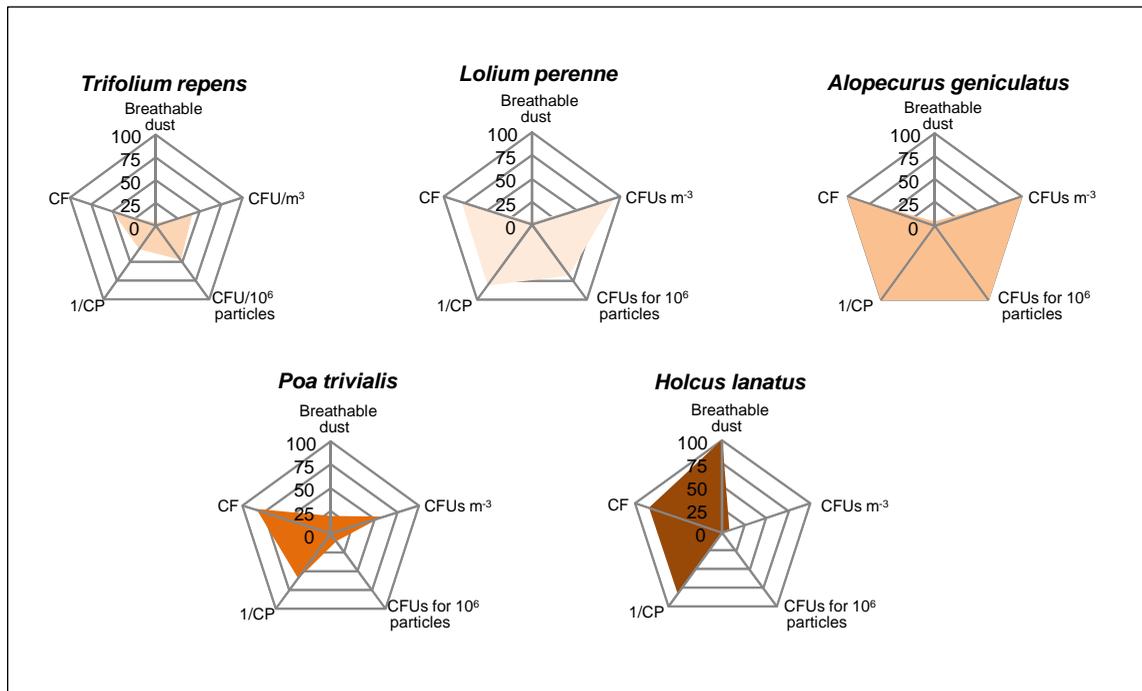


Figure III-4 : Graphic representation of nutritive and health qualities for 5 single-species hays. Values for each parameter are expressed as a percentage of the maximum value (100%) for that parameter observed among all species. Values at 100 % for each parameter are following: Breathable dust → *Holcus lanatus*; CFU/m³ → *Alopecurus geniculatus*; CFU/ 10⁶ particles → *Alopecurus geniculatus*; 1/CP → *Alopecurus geniculatus* and CF → *Alopecurus geniculatus*.

repens with 1017667 CFUs m⁻³. *E. amstelodami*, *E. repens* and *A. versicolor* were found in all the commercial forages and control hay. *E. herbariorum* was found in Haylage Gr (29 CFUs m⁻³) and Haylage Lm (10291 CFUs m⁻³). *A. fumigatus* was also found in Haylage Gr (28 CFUs m⁻³) and Crau hay (21 CFUs m⁻³). *A. caespitosus* was only found in Haylage Gr (30 CFUs m⁻³) (Table III-4).

P. roqueforti was the main *Penicillium* species found in Haylage Gr and Lm (Table III-5). In Haylage Lm, it represented about 97% of *Penicillium* species. *P. piceum* was also identified in all the commercial hays, *P. implicatum* and *P. lividum* in Crau hay, *P. islandicum* in Haylage Gr, *P. verrucosum* in Haylage Lm (Table III-5). No *Penicillium* species was found in control hay.

Among the 15 toxins analysed, no mycotoxin was found in these hays. The amounts of endotoxins, were in the range of Grade I to V (approximately 10 - 10⁴ EU g⁻¹ hay), and differed for some specific treatments. The lower concentration of endotoxins was found in Haylage Lm (Grade I, II and III). Haylage Gr, control hay and Swiss hay were the most contaminated (Grade IV and V) while Crau hay had an intermediate contamination with grade III (Figure III-3).

The commercial forages differed significantly in their pollens contents (Figure III-5; H= 17.12; p<0.005). Haylages Gr and Lm contained the greatest amount of pollen but Crau hay, for example, had very little. However, Haylage Gr was not different to control hay. Between dry forages, Crau hay was the least contaminated with about 10,000 pollens g⁻¹ of hay and the highest contamination was in control hay with about 70,000 pollens g⁻¹ of hay.

IV. Discussion

IV.1 Effect of floristic composition on hay quality (Figure III-4)

Numerous studies have focused on the impact of floristic composition on nutritive value of forages. *Trifolium repens* is commonly sowed with Poaceae such as *Lolium perenne* in temporary grasslands to improve grassland nitrogen balance (Simon *et al.*, 1997), but also to improve nutritive value of hays mainly by increasing protein content (Giovanni 1988). In this study, *Trifolium repens* had actually a better crude protein concentration and a lower crude fiber concentration than Poaceae in general.

Until now, the impact of floristic composition on health quality has never been studied but anecdotal evidence suggests this is a relevant factor. According to farmers, *Holcus lanatus* has to be avoided in grasslands for hay production because of its high capacity to produce dust in hay. This could be the result of the specific morphology of leaves with a high density of epidermic hairs. This study confirmed this empirical knowledge (Figure III-4). On the one hand, in the hypothesis

of an involvement of dust in horse pulmonary diseases, this grass has to be avoided in grasslands for hay production despite its low fungal contamination. Among other species, *Poa trivialis* hay was the dustier but not significantly different from *Trifolium repens* and *Lolium perenne*. On the other hand, while *Alopecurus geniculatus* hay contained little dust, it tends to increase fungal contamination (Figure III-4). Among the 5 species studied, *Trifolium repens*, *Poa trivialis* and *Lolium perenne* combine low dust and low fungal contamination. Moreover, they were characterized as having the best nutritive value.

Only few data are available on mycoflora of specific grasses. Rust species, Ascomycetes like *Chaetomium*, *Alternaria* or *Cladosporium* were observed on grasses in field (Ellis & Ellis, 1985). These authors have shown that various fungi were able to grow on the five plant genera (*Alopecurus*, *Holcus*, *Lolium*, *Poa*, *Trifolium*); nevertheless, mycoflora was studied on fresh matter and not from dust. Moreover, molds like *Aspergillus* and *Penicillium* were not included.

Among the fungi identified in this study, many have already been determined in hay: *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Alternaria alternata* and *Penicillium* spp. (Clarke & Madelin, 1987; Roussel *et al.*, 2004; Reboux *et al.*, 2006; Séguin *et al.*, In press). Some of these genera are known to be important allergens or pathogens (Horner *et al.*, 1995; Denning *et al.*, 2006). Among *Aspergillus* genus, *Eurotium amstelodami* and *Eurotium repens* were dominant. For each single-species hay, they represented more than 50% of *Aspergillus*. Reboux *et al.* (2001), in a study carried out in eastern France, showed that *Eurotium amstelodami* was one of the main causes of Farmer Lung Disease. Recently, Slack *et al.* (2009) have identified toxic secondary metabolites produced by several *Eurotium* species. In addition, *Aspergillus fumigatus*, which is incriminated in RAO, was identified in *Alopecurus geniculatus*, *Poa trivialis* and *Holcus lanatus* hays. This could suggest that *Lolium perenne* and *Trifolium repens* hays would be the most appropriate for equine feed.

From a qualitative point of view, each grassland species appeared to select a particular mycoflora and their hays were characterized by different profiles of mold contamination. Mechanisms explaining the specificity of molds in plant contamination remained unknown, and the impact of wall cell composition of these grassland species should be investigated in relation to mould capacity to hydrolyze complex cell wall compounds.

No mycotoxins among those searched were detected. Nevertheless, many fungal species identified in dust of single-species hay can potentially produce mycotoxins. *Alopecurus geniculatus*, *Holcus lanatus* and *Poa trivialis* hay were characterized by the development of *Aspergillus fumigatus* known to produce several mycotoxins such as gliotoxin, verruculogen, fumagillin and helvolic acid (Boudra *et al.*, 2005). Gliotoxin has potent immunosuppressive, genotoxic, cytotoxic and apoptotic effects (Waring *et al.*, 1988; Nieminen *et al.*, 2002). Gareis & Wernery (1994) have

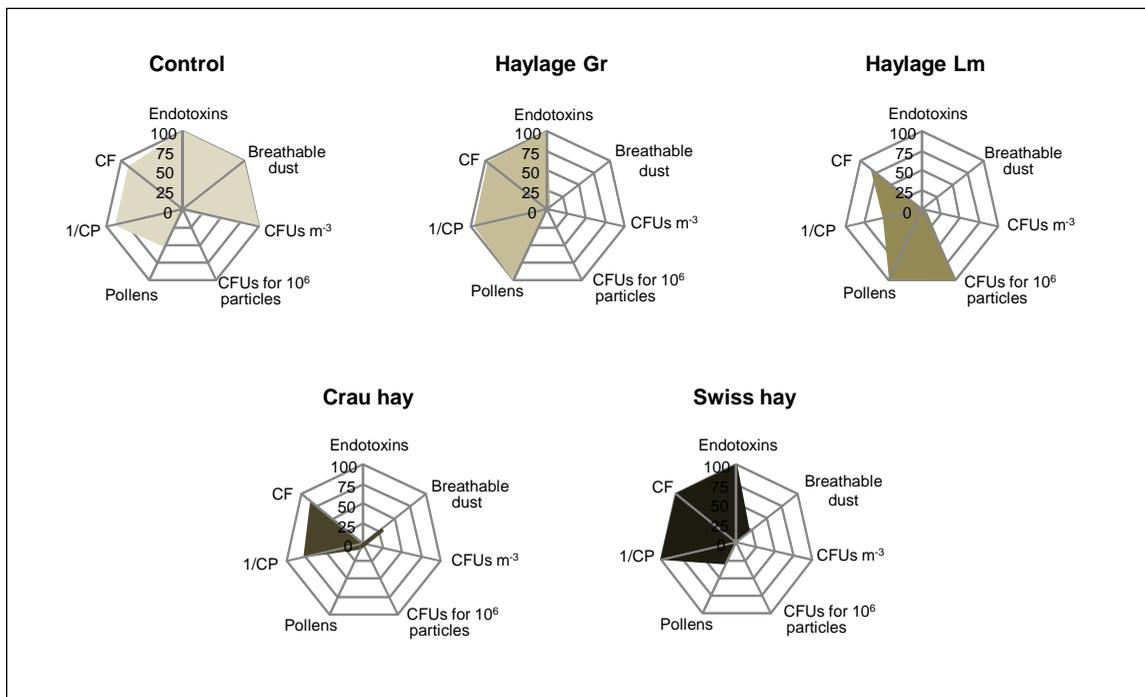


Figure III-5 : Graphic representation of nutritive and health qualities for commercial forages and control hay. Values for each parameter are expressed as a percentage of the maximum value (100%) for that parameter observed among all forage types. Values at 100 % for each parameter are following: Breathable dust → Control; CFU/m³→ Control; CFU/ 10⁶ particles → Haylage Lm; 1/CP → Swiss hay; CF → Swiss hay; Pollens → Haylage Gr and Endotoxins → Haylage Gr, Swiss hay and Control.

reported a case of some camels which died after intoxication by hay contaminated by gliotoxin. Verruculogen has tremorgenic and genotoxic activities (Land *et al.*, 1987; Sabater-Vilar *et al.*, 2003), fumagillin is cytotoxic and genotoxic (Amitani *et al.*, 1995; Ingber *et al.*, 1990) and helvolic acid showed cytotoxic activities (Amitani *et al.*, 1995). *Trifolium repens* hay was characterized by the presence of *Penicillium roqueforti*, a strain previously isolated from baled grass silages (O'Brien *et al.*, 2005). This mold is known to produce several mycotoxins: penicillic acid, PR toxin, roquefortine, isofumigaclavines A and B, mycophenolic acid and cyclopiazonic acid (O'Brien *et al.*, 2006). Some of these mycotoxins have neurotoxic properties (Wagener *et al.*, 1980) or can stimulate inflammatory responses *in vivo* (Rand, 2005).

IV.2 Comparison of quality between commercial forages (Figure III-5)

As the analysis of single-species hays demonstrated that floristic composition of hay modifies nutritive and health quality, it is not surprising that commercial forages, which were obtained from different grassland species, also had contrasting quality. Nevertheless, the effect assigned to agricultural practices and environmental conditions linked to hay and haylage production may be at least as important as floristic composition of the forage product (Séguin *et al.*, In press). Indeed, the type of forage conservation and the percent of moisture are more important. According to Demarquilly *et al.* (1998), the nutritive value of haylage is similar or superior to the nutritive value of hay. In this study, haylages were not dissimilar to dry hays in relation to nutritive value. Haylage Lm was similar to Crau hay with a lower crude fiber and a higher crude protein content while Haylage Gr was similar to Swiss hay with high fibre and lower protein content.

Haylages, and particularly Haylage Lm, were less dusty than dry hays. This result is in accordance with the study by Vandenput *et al.* (1997). Nevertheless, about 87% of dusts in Haylage Lm were identified as fungal spores. This contamination was much greater than for Haylage Gr, Crau hay or Swiss hay, in particular for *Penicillium* and *Aspergillus* genera.

However, this haylage was less contaminated by mould than classical hay.

The high contamination of Haylage Lm could be the result of the making process. One of main fungal species developed in haylages was *Penicillium roqueforti*. This mold has ability to grow at low oxygen content, high carbon dioxides concentrations, and low temperatures (Moreau, 1980).

Haylage is frequently used to replace dry hay in equine breedings so as to avoid or reduce horses respiratory diseases (Billysson, 2002). Our results confirm that those forages are less dusty but can be more contaminated by molds than other forages, even dry hays.

Relationships between results obtained for multi-species commercial forages and single-species hays can be suggested. For example, Crau and control hays that contain *Holcus lanatus* were the dustier. Nevertheless, the mould contamination of Crau and Swiss hays was not different.

Molds identified in single-species hays have also been identified in multi-species hays. These include *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium* and *Rhizomucor*, for example. *Rhizomucor* genus identified in *Alopecurus geniculatus* and *Trifolium repens* hays were also identified in Swiss hay that contains these two plant species.

In multi-species hays, even if no mycotoxins were identified among the 16 searched, some genera like *Aspergillus*, *Penicillium* and *Stachybotrys* are potentially toxinogenic. Among these molds, *Stachybotrys chartarum* can produce trichothecenes incriminated in rhinitis, neurologic disorders and death of horses (Mahmoudi & Gershwin, 2000). Besides, because of the lack of mycotoxins detected in hays, the multimycotoxin method could be improved by lowering the quantification limits and by the detection of others mycotoxins such as *Penicillium roqueforti* toxins.

Although the test we used for endotoxins measurement was semi-quantitative, it revealed differences in their accumulation for the different products. For example, Halayge Lm and Crau hay, showed the lowest range of endotoxin concentrations compared with the other forages (Figure III-5).

Finally, the amount of pollens collected were higher in haylages than in dry hays (Figure III-5), probably due to the mechanical effect during the making process and the dryness in the latter. However, because haylages having high residual humidity, it is probable that only a very small proportion will be found in breathable dust. Surprisingly, the Crau hay, was also characterized by a low level of pollens compared to the 2 others dry hays.

V. Conclusion

Horse breeders have to find a compromise between nutritive and health quality in order to obtain the expected performance and avoid equine pulmonary diseases like RAO. Even if haylage is characterized by good nutritive value little dust, it can be more contaminated by molds than hay. However, the health quality of dry hay can be obviously improved as shown for the Crau and Swiss mix hays (Figure III-5). Overall results suggest that with the aim of increasing hay quality for horse feeding, several strategies could be combined: i) the choice of grassland with an optimal specific floristic composition and, therefore, ideally sown with superior plant species (*Lolium perenne* or *Poa trivialis*, for example) showing low dust and mould contaminations, and avoiding species such as *Alopecurus geniculatus* or *Holcus lanatus* ; ii) the combination of agricultural practices

that reduce dustiness and fungal propagation (Séguin *et al.*, In press), through, for example, an optimal drying of plant material from harvest to storage and iii) the optimization of the forage making process as illustrated by the differences found between 2 commercial haylages (high endotoxin and low fungal or *vice et versa*) and 2 commercial dry hays. However, this last part obviously requires more detailed studies.

Acknowledgements

This work was partly funded through a PhD Grant to V. SEGUIN from the “Conseil Régional de Basse-Normandie” while this project has been approved by the “Pôle de Compétitivité Filière Equine”. Authors would like to acknowledge the staff of the INRA experimental unit of Borculo (P. GEORGET, S. CLOUARD, T. CORBET, M. AUBRY, B. GUIBOUT, J. LEVALLOIS and M. ROUILLON), from Laboratoire Départemental Frank Duncombe (M. HOUSSIN and R. PICQUET) and from UMR INRA EVA (D. BALLOIS, R. SEGURA and A.F. AMELINE) for their kind and skilful support, as well as B. de LOYNES D’ESTREE for her efficient help with hay dust analysis. We would like also to acknowledge the participation of Joe Denham of the Society Haylage.biz and ECOLIT society, in this study. We would also like to acknowledge Dr Anthony GORDON for improving the English of the manuscript.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'une prise en compte des besoins de la filière équine, notamment en termes d'amélioration de la qualité sanitaire des fourrages en vue de réduire le développement de maladies pulmonaires équines à forte prévalence telles que la MORVR. Pour y parvenir l'identification et la compréhension des mécanismes qui modifient la qualité du foin étaient un préalable indispensable. Dans ce contexte, 3 objectifs principaux ont été identifiés :

- ✓ Le développement préalable des méthodologies requises pour l'évaluation de la qualité sanitaire des fourrages.
- ✓ L'identification des facteurs pouvant influencer cette qualité
- ✓ La hiérarchisation de ces facteurs.

Dans un premier temps, la validité des méthodes utilisées ainsi que la variabilité des critères d'évaluation seront abordées. Dans un second temps, les effets des différents facteurs pouvant influencer la qualité sanitaire seront discutés plus précisément pour aboutir à de possibles solutions d'amélioration tout en faisant émerger les perspectives de recherche découlant de ces résultats.

I. Développement d'une méthodologie d'évaluation de la qualité sanitaire des fourrages

L'évaluation de la qualité sanitaire d'un fourrage constituait un premier écueil dans la mesure où il n'existe pas de méthodes de mesure simples utilisables en routine. Il est possible d'analyser le contenu biochimique d'une matrice végétale, de mesurer les composants aériens dans une étable, mais il est moins aisé d'évaluer le potentiel d'une botte de foin à contaminer l'air respiré par un cheval. Cela a donc nécessité la mise en place de protocoles normalisés pour extraire et analyser de façon reproductible les différents constituants de la poussière du foin. Deux types d'extraction des poussières ont été testés : une extraction aérienne et une extraction liquide.

La méthode d'extraction des poussières aériennes est inspirée de la méthode standardisée développée par Vandenput *et al.* (1997). Cette méthode consiste à placer un échantillon de 100 g dans une enceinte hermétique dans laquelle est insufflé un flux d'air de 200 L/min. Les

poussières mises en suspension sont ensuite dirigées vers une autre chambre contenant le compteur de particules. La mesure est réalisée à partir de la quatrième minute suivant le début du flux d'air et un litre d'air est échantillonné. Ne disposant pas d'un matériel analogue, nous avons modifié le procédé. Les quantités de poussières obtenues par Vandenput *et al.* (1997) et Kirschvink *et al.* (2002) qui ont employé la même méthode, sont inférieures à celles obtenues par notre méthode pour les foins secs. Cette différence peut s'expliquer par notre temps de mesure plus long (30 min pour les foins secs) et ceci après un brassage de 30 secondes. Pour notre étude, en sachant que le débit du compteur est de $1.2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, le volume d'air échantillonné est alors de 36 L et non de 1 L comme pour les études citées précédemment.

Pour la quantification des organismes fongiques, ces mêmes auteurs ont employé un échantillonneur de type Andersen permettant de collecter les poussières directement sur une lame de microscope ou sur une boîte de pétri contenant le milieu de culture adéquat. Ce type d'appareil est constitué de plusieurs étages et permet de récolter les particules par classe de taille. Dans notre étude, nous avons utilisé un compteur de particules qui a permis de récolter, après comptage par classe de taille, les poussières aspirées sur un filtre, mises ensuite en culture. Nos résultats concernant les unités formant colonie (UFCs) totales ne peuvent pas être directement comparés car les auteurs cités précédemment n'ont quantifié que les 3 espèces suivantes : une moisissure, *Aspergillus fumigatus* et deux actinomycètes thermophiles, *Faenia rectivirgula* et *Thermoactinomyces vulgaris*. Nos résultats concernant *Aspergillus fumigatus*, dans les foins produits expérimentalement sont inférieurs à ceux obtenus pour un foin considéré comme étant de bonne qualité par Vandenput *et al.* (1997). Seuls deux foins de notre étude présentent une contamination supérieure : le foin récolté à 75 % MS et celui exposé à une pluie après coupe lors de la première année d'expérimentation. De plus, même si le genre majoritairement identifié dans notre étude était le genre *Aspergillus* (Figure 52) ou des genres apparentés tels que *Eurotium* ou *Emericella*, seule une minorité de foins contenait *Aspergillus fumigatus*. Parmi les genres *Aspergillus* et apparentés, les espèces dominantes étaient *Eurotium amstelodami* et *E. repens*. Elles représentaient toujours plus de 50 % des UFCs totales. Ces résultats corroborent ceux de Hnatyszczym et Guais (1986) qui ont montré que la mycoflore d'un foin est dominée par des *Aspergillus* du groupe *glaucus* comprenant les espèces citées précédemment. Dans ce genre, une espèce, *Eurotium amstelodami*, est incriminée dans une maladie pulmonaire humaine, la 'maladie du poumon du fermier'. De plus, récemment, Slack *et al.* (2009) ont révélé que ce genre fongique pouvait produire des métabolites secondaires toxiques. *Aspergillus fumigatus* était majoritairement présent lorsque les foins présentaient une mauvaise qualité sanitaire. En effet, comme l'ont montré Hnatyszczym & Guais (1986), la flore fongique de stockage est différente selon la qualité sanitaire d'un foin. D'après nos résultats, les

foins récoltés dans de mauvaises conditions de récolte (75 % MS, pluie après coupe) sont caractérisés par une forte contamination fongique et notamment des espèces potentiellement toxigènes, pathogènes ou allergènes qui ne sont pas détectées ou très peu détectées (Figure 52) dans les foins récoltés dans de bonnes conditions de récolte (témoin). Par exemple, le foin ayant reçu une pluie après coupe, se distingue des foins témoins (Figure 52) par sa contamination dominée, non plus par le genre *Aspergillus* mais par le genre *Penicillium*. De plus, en comparaison avec les foins témoins, ce foin se caractérise par la présence de nouvelles espèces potentiellement toxigènes comme *Aspergillus niger* ou *A. fumigatus*, également incriminé dans l'étiologie de la MORVR.

L'extraction liquide des poussières a permis de développer des méthodes : i) de quantification et d'identification des pollens ; ii) de quantification de la contamination des fourrages par le sol en déterminant la masse minérale des poussières et iii) de quantification des endotoxines en utilisant une approche semi-quantitative.

La méthode utilisée pour les pollens est issue de la méthode employée par le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA) mais compte tenu du peu d'informations disponibles dans la littérature, les résultats obtenus peuvent être difficilement comparés. De façon similaire, en ce qui concerne l'évaluation de la contamination des fourrages par le sol et par les endotoxines, il n'existe pas non plus à notre connaissance de données bibliographiques permettant d'assurer une comparaison. En effet, la majorité des études sur les endotoxines concerne la contamination de l'air par les endotoxines dans le domaine industriel ou agricole (Krysinska-Traczyk *et al.*, 2004 ; Spaan *et al.*, 2006 ; Berndt *et al.*, 2008), or dans notre étude, le dosage a été réalisé à partir d'une extraction liquide des poussières. Ceci ne permet donc pas de comparer nos données exprimées en EU.g⁻¹ de foin à celles de ces études exprimées, par exemple, en EU.m⁻³.

La méthode d'évaluation des mycotoxines sur la matrice végétale, a été développée à partir de la méthode développée pour les ensilages de maïs par Garon *et al.* (2006) et pour les tourteaux d'oléagineux par Lanier *et al.* (2009). Cette méthode permet de rechercher et de quantifier 16 mycotoxines dans le foin. Compte tenu de notre sujet de recherche, une seconde méthode a également été développée afin de quantifier les mycotoxines dans les poussières aériennes issues des fourrages. Ces deux méthodes ont permis de comparer des foins contrastés.

Tableau XVI : Récapitulatif des codes attribués aux foins pour les analyses multivariées .

		Foins	Codes
Année 2007	Récolte précoce	Témoin	CONTb1e
		Séchage en grange	BARNb1e
		Enrubanné	HAYLb1e
	Récolte tardive	Témoin	CONTb1l
		Enrubanné	HAYLb1l
		Coupe à 3 cm	CUT3b1l
		Coupe à 7 cm	CUT7b1l
		Taupinières	MOLEb1l
		Crottins de cheval	DUNGb1l
		Niveau de pressage supérieur	PRESb1l
Seconde coupe	Fanage tardif	TOSSb1l	
	Récolte à 75 % MS	HUMb1l	
	Pluie après coupe	RAIAb1l	
		Témoin	SECOb1l
Année 2008	Récolte précoce	Témoin	CONTb2e
		Séchage en grange	BARNb2e
		Enrubanné	HAYLb2e
		Acide propionique	PROPb2e
		Récolte à 75 % MS + Acide propionique	PRHUb2e
		Bactéries lactiques	LACTb2e
		Récolte à 75 % MS + Bactéries lactiques	LAHUb2e
		Nombre de fanage supérieur	EXTOb2e
	Récolte tardive	Pluie avant coupe	RAIBb2e
		Pluie après coupe	RAIAb2e
		Récolte à 75 % MS	HUMb2e
		Témoin	CONTb2l
		Enrubanné	HAYLb2l
		Taupinières	MOLEb2l
		Fanage tardif	TOSSb2l
		Récolte à 75 % MS	HUMb2l
Seconde coupe	Pluie avant coupe	RAIBb2l	
	Pluie après coupe	RAIAb2l	
		Témoin	SECOb2l

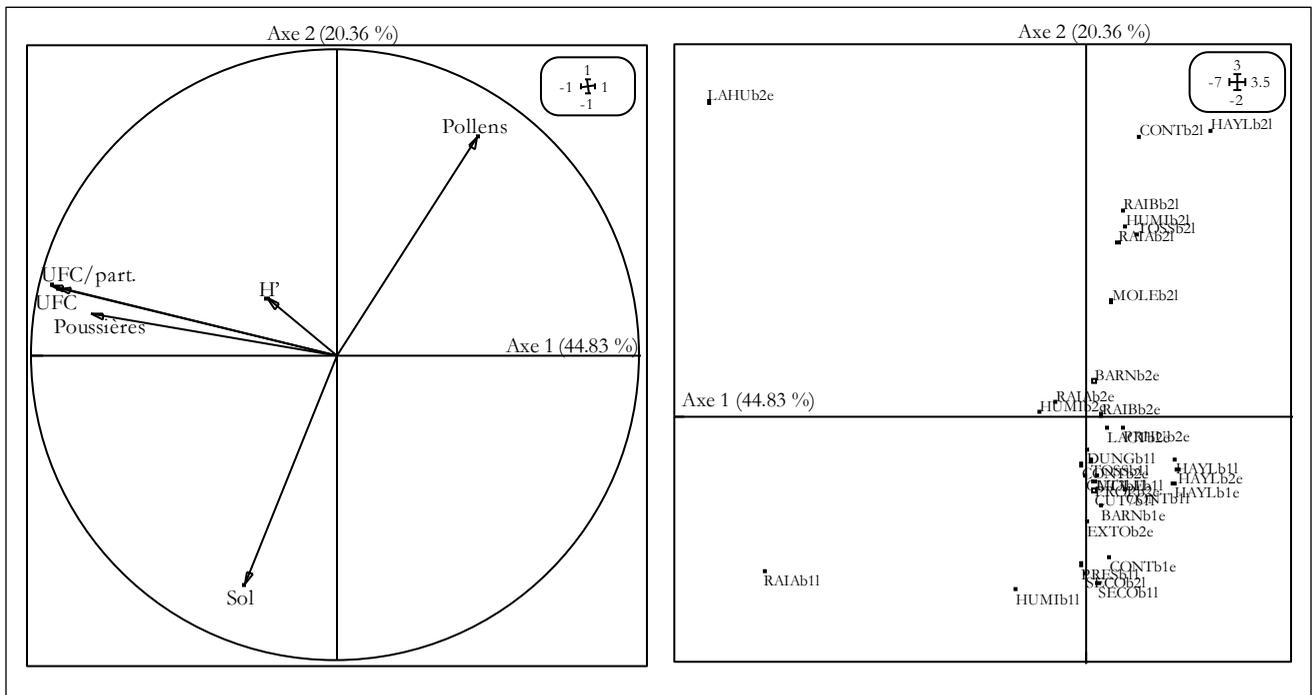


Figure 53 : Analyses en Composantes Principales des données récoltées à partir des deux années d'expérimentation au champ décrites respectivement au sein des chapitres 1 et 2 des résultats. A : Carte factorielle des critères d'évaluation de la qualité sanitaire des fourrages et B : des différents traitements dans le plan 1-2 qui représente 65,19 % de l'inertie. Deux critères de qualité dont les vecteurs se superposent sont corrélés, deux critères dont les vecteurs sont perpendiculaires sont indépendants l'un de l'autre.

La méthodologie mise au point au début de ce travail de doctorat a abouti à un protocole permettant de discriminer certains fourrages par rapport à d'autres. Néanmoins, certains critères peuvent présenter une sensibilité plus importante par rapport aux traitements mais également vis à vis de facteurs environnementaux comme les conditions climatiques. Ainsi, d'après notre étude, le nombre d'UFCs des poussières respirables apparaît comme le critère le plus sensible aux traitements. Il présentait, par exemple en 2007, lors de la 1^{ère} année d'expérimentation au champ, un coefficient de variation d'environ 290 % (*Chapitre I des résultats, Table I-6*) pour l'ensemble des traitements appliqués. Les autres critères sont moins sensibles aux traitements, leurs coefficients de variation fluctuent entre 25 et 67 %.

II. Critères de qualité des foins produits en 2007 et 2008

Les deux années de production de foin expérimental se sont révélées très contrastées en termes de climat. L'année 2007 est marquée par une forte pluviométrie estivale assez atypique pour la production de foin (pluviométrie cumulée de Mai à Juillet de 340 mm contre une moyenne sur 10 ans de 180 mm) alors que l'année 2008 peut être considérée *a priori* comme une année de bonnes conditions de production (pluviométrie cumulée de Mai à Juillet de 110 mm). Les résultats relatifs à la qualité de foin ne se superposent pas nécessairement pour de mêmes traitements appliqués les deux années puisque les interactions climat*traitement ne sont pas les mêmes. En effet, malgré les mauvaises conditions météorologiques en 2007, les foins témoin présentent de plus faibles contaminations par les poussières ou organismes fongiques, par exemple, que les foins témoin produit l'année suivante (2008). Ceci suggère que les conditions météorologiques avant la fauche conditionnent très faiblement la qualité sanitaire du fourrage vis-à-vis des conditions météorologiques post-fauche. Les fortes pluviométries de 2007 ont amplifié les effets négatifs de certains traitements comme la récolte à 75 % MS ou la simulation d'une pluie après coupe.

Nous avons donc cherché à établir des constantes dans les critères de qualité, les effets des traitements, et indirectement des facteurs explicatifs en réunissant les résultats issus des deux années de production. Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée sur les foins produits expérimentalement, afin de confronter l'ensemble des traitements mais aussi les critères de qualité. La figure 53 représente d'une part les corrélations entre les critères d'évaluation de la qualité (Figure 53A) et d'autre part la distance entre les différents traitements (Figure 53B). Le tableau XVI présente les codes attribués au sein de l'ACP pour les différents fourrages produits et analysés. Deux critères de qualité dont les vecteurs se superposent sont corrélés, deux critères

dont les vecteurs sont perpendiculaires sont indépendants l'un de l'autre. Dans un premier temps, les UFCs, les UFCs exprimées par particule de poussières, et la quantité de poussières se révèlent corrélés. Dans la plupart des cas, un foin très contaminé par les poussières est également très contaminé par les microorganismes fongiques comme cela a été montré au sein du *chapitre I des résultats*. Ces critères discriminent deux foins particulièrement poussiéreux et contaminés : le foin ayant reçu une pluie après coupe lors de la récolte tardive de 2007 (RAIAb1l) et le foin avec des bactéries lactiques récolté à 75 % MS lors de la récolte précoce de 2008 (LAHUb2e). A l'opposé de ces 2 foins, des enrubannés de première et seconde année (HAYLb1l, HAYLb2e et HAYLb1e) se détachent du groupe et apparaissent moins poussiéreux et moins contaminés par des spores fongiques. La contamination par le sol est inversement corrélée à la contamination par du pollen. Une des hypothèses émises pour expliquer ce résultat concerne les conditions météorologiques. En effet, le foin ayant subi une pluie après coupe en 2007 (RAIAb1l) présente une faible quantité de pollen et à l'inverse une forte contamination par le sol. Les pluies ont pu entraîner un lessivage des grains de pollen tout en augmentant la quantité de sol contaminant le foin durant le séchage. Ce deuxième groupe de critères de qualité s'avère indépendant de la quantité de poussière et de spores fongiques. Ce résultat peut être lié aux deux modes d'extraction de la poussière puisque le pollen et le contenu en sol ont été obtenus par extraction liquide. De plus, ces deux critères sont indépendants des taux de contamination fongique, par exemple, car les pollens et les poussières minérales ne dépendent pas du taux d'humidité de la matrice comme c'est le cas pour les moisissures. Ces deux critères permettent de disperser le nuage de point correspondant aux foins (Figure 53). Certains foins sont discriminés par un contenu en pollen important comme le foin témoin de la récolte tardive de 2008 (CONTb2l) et l'enrubanné de la récolte tardive de 2008 (HAYLb2l). D'autres à l'opposé, comme le foin ayant subi une pluie après coupe en 2007 (RAIAb1l) et le foin récolté à 75 % MS en 2007 (HUMIb1l), se détachent du groupe par une contamination par le sol. La diversité fongique estimée par l'indice de Shannon (H') ne s'éloigne que très peu du centre dans le plan 1-2 et n'a que peu d'influence sur la répartition des foins et donc leur discrimination.

Afin de comprendre ce qui régissait la qualité des foins, des Analyses en Composantes Principales sur Variables Instrumentales (ACPVI) ont été réalisées. Elles confrontent la première ACP à des variables qui ont été choisies comme « variables instrumentales » ou « variables explicatives ». Une première ACPVI (ACPVI1) a été réalisée sur la base de caractéristiques des bottes de foin : le taux d'humidité au pressage et à l'analyse, et la densité (Figure 54). Une seconde analyse (ACPVI2) a concerné des facteurs climatiques de la fauche au pressage (Figure 55), à

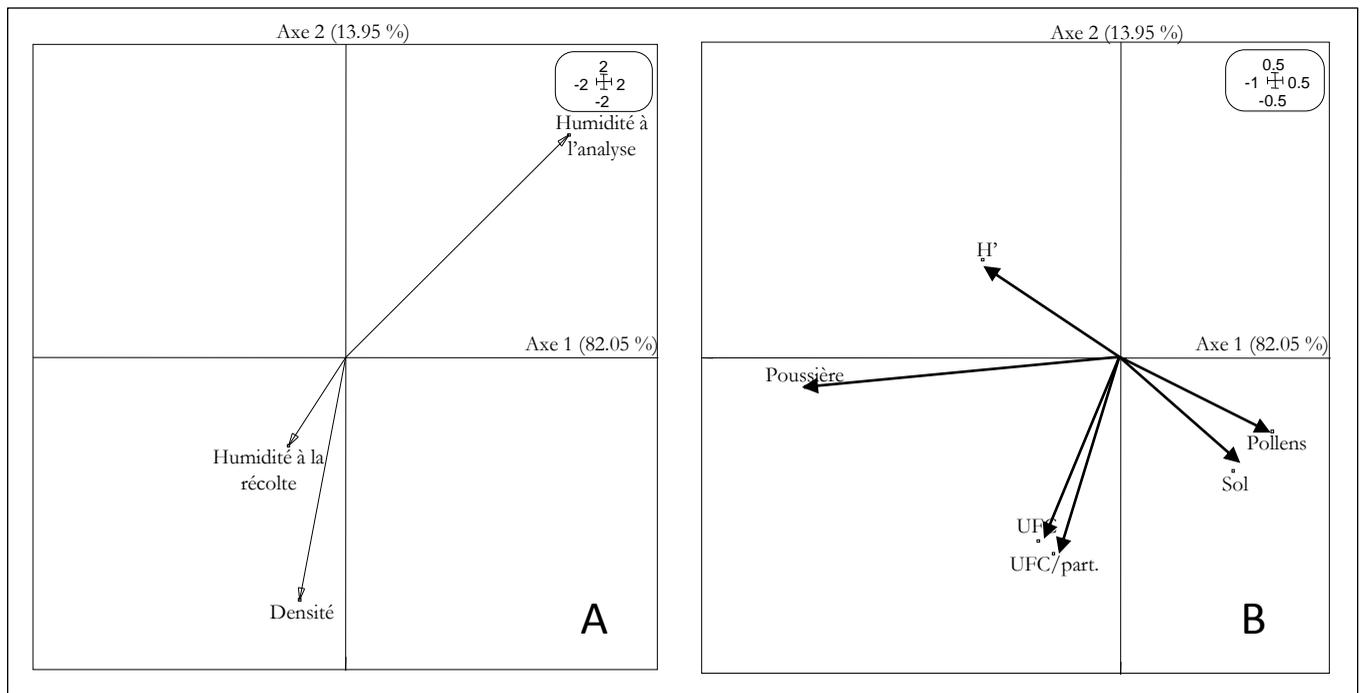


Figure 54 : Représentation dans le plan défini par les deux premiers axes (96% de l'inertie), de l'Analyse en Composantes Principales sur Variables Instrumentales (ACPVI1). A: Variables explicatives (densité, humidité au pressage et à l'analyse) ; B: Critères d'évaluation de la qualité sanitaire des fourrages. Les données utilisées sont issues des expérimentations décrites respectivement au sein des chapitres 1 et 2 des résultats.

savoir la vitesse du vent, la pluviométrie et la température. Ces données météorologiques sont issues des relevés de la station météorologique située sur le domaine expérimental INRA du Pin-au-Haras.

Le plus souvent le taux d'humidité au pressage et lors de la conservation ainsi que la densité sont les principaux facteurs incriminés lorsque le foin présente une mauvaise qualité sanitaire. D'après l'AFCV11, 20,52 % ($p < 0,01$) de la variance des critères de qualité dépendent des caractéristiques de la botte, dont 14,23 % ($p < 0,01$) sont attribués au taux d'humidité à l'analyse, 10,19 % ($p < 0,05$) à la densité et 4,31 % (ns, $p > 0,05$) au taux d'humidité au pressage. La figure 54 représente, dans un plan défini par les deux premiers axes, les corrélations existant entre les variables explicatives d'une part (Figure 54A) et les critères de qualité (Figure 54B). Densité et humidité à l'analyse sont inversement corrélées et ont un impact principalement sur la contamination fongique. Une botte de foin dense et humide à la récolte est une botte fortement contaminée par des spores fongiques. Un foin à haute densité comparé à un foin à moyenne densité, présente généralement une contamination fongique plus élevée car il est généralement récolté plus humide et du fait de sa haute densité, l'air circule mal rendant les conditions défavorables à un séchage optimal au cours du stockage.

Les conditions météorologiques lors de la récolte, conditionnent également la qualité sanitaire des fourrages. Depuis les années 60, les conditions météorologiques et plus précisément de faibles températures et une haute humidité, en été, sont considérées comme des facteurs étiologiques d'une maladie pulmonaire humaine, la 'maladie des poumons du fermiers' (Emanuel *et al.*, 1964 ; Hapke *et al.*, 1968) car elles favorisent le développement fongique. Par la suite, Terho *et al.* (1987), ont mis en évidence une corrélation entre la pluviométrie, l'ensoleillement et l'apparition de la maladie des poumons du fermier. Plus l'été était pluvieux avec un faible ensoleillement, plus les conditions étaient favorables au développement fongique et plus de personnes atteintes étaient identifiées. Cependant, Takahashi *et al.* (2002), ont récemment suggéré après exploitation de données météorologiques de 20 saisons de récoltes, que c'était uniquement la température et la durée d'ensoleillement qui étaient fortement corrélées à la prévalence de la maladie. Ces conclusions peuvent également être appliquées au cas de la MORVR. En effet, Ward & Couëtil (2005) ont mis en évidence que les aéroallergènes de l'air ambiant ainsi que les facteurs climatiques expliquaient 30 % de la variance de la prévalence de la maladie chez les chevaux. Nous avons cherché à connaître l'impact des conditions climatiques sur la qualité des foins que nous avons produit expérimentalement aux cours de deux années par une

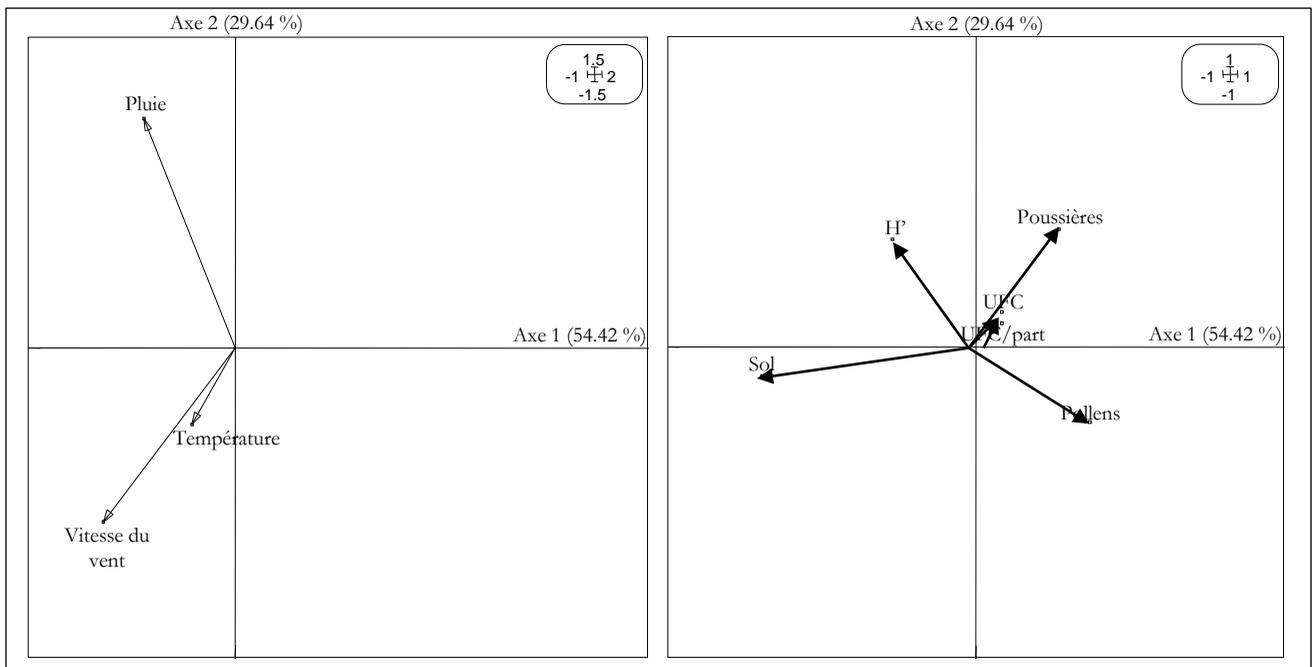


Figure 55 : Représentation dans le plan défini par les deux premiers axes, de l'Analyses en Composantes Principales sur Variables Instrumentales (ACPVI2). A Variables explicatives (Vitesse du vent, Température, pluviométrie); B: Critères d'évaluation de la qualité sanitaire des fourrages. Les données utilisées sont issues des expérimentations décrites respectivement au sein des chapitres 1 et 2 des résultats.

seconde ACPVI (Figure 55). D'après cette ACPVI, les conditions climatiques de la fauche au pressage, expliquent 20,61 % ($p < 0,01$) de la variation des critères d'évaluation de la qualité sanitaire. Parmi ces facteurs, la vitesse du vent contribue significativement à 10,90 % ($p < 0,01$) et la pluie à 10,50 % ($p < 0,01$). Contrairement à Takahashi *et al.* (2002), la contribution de la température ne s'est pas révélée significative pour cette étude, toutefois, seules les données concernant les semaines de récoltes de 2007 et 2008 ont été considérées. L'analyse de l'ACPVI2 (Figure 55) montre que la pluie et la vitesse du vent ont des effets assez indépendants. La pluie accroît la diversité fongique, probablement en créant des conditions écologiques favorables et réduit la contamination par les pollens qui sont probablement entraînés par lessivage. Le vent réduit la quantité de poussières mais augmente la contamination par le sol.

D'après les résultats des deux années d'expérimentation au champ, une corrélation existe donc entre les poussières et les organismes fongiques alors que la contamination par les pollens et par le sol sont inversement corrélées. Il s'avère également que d'autres facteurs, en plus de ceux testés, déterminent la qualité sanitaire, à savoir, par ordre décroissant, le taux d'humidité à l'analyse, la vitesse du vent et la pluviométrie de la fauche au pressage et la densité de pressage. La température au cours de la récolte ainsi que le taux d'humidité au pressage n'ont, quant à eux, aucun effet sur la variance des critères d'évaluation de la qualité sanitaire.

III. Effets des pratiques culturales et des conditions météorologiques sur la qualité sanitaire des fourrages

Les pratiques culturales ainsi que les conditions météorologiques testées, ont eu des effets contrastés sur la qualité sanitaire des fourrages. Le choix du taux d'humidité à la récolte, le mode de séchage, l'application d'additifs de conservation, et la simulation d'une pluie après coupe se sont révélés être les traitements qui ont eu le plus d'effet sur la qualité du fourrage. D'autres traitements comme le dépôt de taupinières, ont eu un effet moins marqué.

III.1 Le taux d'humidité

III.1.1 Humidité à la récolte (Chapitre I & II)

Les foins récoltés à 75 % MS ont été caractérisés par une production importante d'organismes fongiques et de poussières qu'ils soient récoltés en 2007 ou en 2008. Dans les foins récoltés trop humides, à 75 % MS, la température au cours du stockage a tendance à augmenter. Ces températures accrues peuvent expliquer la présence d'espèces thermo-tolérantes et potentiellement toxigènes comme *Aspergillus fumigatus* (Chapitre I et II) associée selon Boudra *et al.* (2002) à un échauffement des balles de foin atteignant parfois des valeurs de 43 à 88 °C. D'autres espèces potentiellement toxigènes, allergènes ou pathogènes, ont été identifiées dans ces foins telles que *Acremonium bacillisporum*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* ou encore *Aspergillus parasiticus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. carneus*.

Une récolte à 75 % MS peut également entraîner la production de mycotoxines comme la zéaralénone qui a été retrouvée dans le foin récolté à 75 % MS lors de la première et seconde année de production jusqu'à des valeurs pouvant atteindre 152 mg.kg⁻¹ en 2007. A notre connaissance, peu d'études ont mis en évidence la présence de cette mycotoxine dans les foins (Coulombe, 1993 ; Buckley *et al.*, 2007). Elle est produite par le genre *Fusarium* et plus particulièrement par *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* et *Fusarium equiseti*. Les spores du genre *Fusarium* sont humides et de taille importantes, ce qui explique leur absence dans les poussières respirables qui ont été analysées. Deux hypothèses subsistent pour expliquer la présence de zéaralénone dans le foin. Premièrement, la mycotoxine a pu être produite avant la fauche car le genre *Fusarium* se développe majoritairement au champ par temps humide et notamment lors de la floraison des *Poaceae* (Scudamore & Livesey, 1998 ; Whitlow & Hagler, 2002). Deuxièmement, elle a pu être produite lors de la conservation, suite à une compétition pour les nutriments entre les champignons « de champ » et les champignons « de stockage » (Buckley *et al.*, 2007). C'est une mycotoxine potentiellement dangereuse pour le cheval dont les principaux effets sont oestrogéniques. Gimeno & Quintanilla (1983) ont en effet relaté des cas de mycotoxicoses après l'ingestion de maïs contaminé par la zéaralénone.

Des teneurs en endotoxines plus élevées (Grade III) que le témoin (Grade I), ont été constatées pour ces foins lors de la première récolte en 2007 (Chapitre I). Ce résultat n'a pas été retrouvé en 2008, la gamme d'endotoxines révélées dans le foin récolté à 75 % MS de la récolte précoce était équivalente à celle du témoin de la même récolte.

La mise en botte d'un foin relativement humide entraîne par conséquent une détérioration de la qualité sanitaire du fourrage sec et, plus particulièrement une augmentation des poussières, des organismes fongiques et du risque de contamination par des mycotoxines et endotoxines.

III.1.2 Humidité durant la conservation (Chapitre I, II & III)

Le taux d'humidité lors de la conservation des fourrages peut entraîner des modifications de la qualité sanitaire des foins. Le taux d'humidité à la récolte définit le type de fourrage : les fourrages secs récoltés à 85 % MS comme le foin et les fourrages humides récoltés et conservés à des teneurs en matière sèche de 15 à 65 % MS comme l'ensilage. On peut classer les ensilages en 3 catégories (Finner, 1966) : ensilage en silo ayant un pourcentage de MS compris entre 15 et 40 % MS, ensilage en balle ronde ayant un pourcentage de MS de 35 à 50 % MS et l'enrubannage ayant un pourcentage de MS supérieur à 50 % MS.

Actuellement, l'enrubannage tend à remplacer le foin dans la ration alimentaire du cheval car il est réputé peu poussiéreux et peu contaminé par les organismes fongiques (Holmquist & Müller, 2002 ; Schwarz *et al.*, 2005). Une étude portant sur la préférence des chevaux entre l'ensilage, l'enrubannage et le foin, réalisée par Müller & Udén (2007), montre que la préférence des chevaux se porte d'abord sur l'ensilage, puis l'enrubannage et, en dernière position, le foin qui présente le plus faible taux de consommation.

Raymond *et al.* (1997) ont déterminé une concentration de $6,5 \cdot 10^4$ particules de poussières/L d'air pour un enrubanné contre $9,5 \cdot 10^5$ pour un fourrage de luzerne et de fléole, issus du même dispositif expérimental. Ces valeurs sont nettement inférieures à celles déterminées au cours de notre étude qui varient de $4,1 \cdot 10^5$ à $133 \cdot 10^5$ particules/ L d'air pour les enrubannés contre 387 à $692 \cdot 10^5$ particules/ L d'air pour les foins 'témoin' produits expérimentalement lors des deux années de production. Des valeurs équivalentes ont, toutefois, été mesurées pour le 'Haylage Lm' (Chapitre III) qui présentait $8 \cdot 10^4$ particules/ L d'air. Vandenput *et al.* (1997), qui ont analysé de l'ensilage de *Poaceae* présentant des taux de MS équivalents à des enrubannés, à savoir entre 78 et 50 % MS, ont déterminé des valeurs encore plus faibles qui sont respectivement, de $8,7 \cdot 10^3$ et $4,5 \cdot 10^3$ particules/ L d'air. La plus faible valeur était attribuée aux fourrages ayant le plus haut taux d'humidité. Ces résultats s'expliquent par les techniques employées qui sont différentes d'une étude à l'autre, comme cela a été discuté dans la première partie de la discussion.

La variation de la teneur en poussières des enrubannés semble être liée au taux d'humidité au pressage et lors de la conservation. En effet, l'enrubanné produit en 2007 lors de la récolte précoce présente la plus faible concentration en poussière mais également le plus faible pourcentage de MS (41 % MS) (*Chapitre I*) alors que l'enrubanné produit en 2008 lors de la récolte tardive présente la plus forte concentration en poussières mais également le plus haut pourcentage de MS (67 % MS) (*Chapitre II*).

Lors de la première année de production de foin, la contamination fongique des enrubannés était nettement inférieure à celle des 'témoins', toutefois, en raison d'une forte hétérogénéité, les différences n'étaient pas significatives (*Chapitre I*). De même, l'enrubanné produit à partir d'un mélange de *Lolium multiflorum* 'Haylage Lm' avait une contamination fongique plus faible que le contrôle mais pas de manière significative (*Chapitre III*). Lors de la seconde année de production (*Chapitre II*), l'enrubannage permet de réduire significativement la contamination fongique par rapport aux foins 'témoins' des récoltes précoces et tardives.

Les enrubannés paraissent donc avoir une meilleure qualité sanitaire en terme de contamination par les poussières et les moisissures. Leur qualité aussi bien nutritive que sanitaire réside dans la qualité du stockage et dans la préservation des conditions anaérobiques. Si ces conditions anaérobiques sont interrompues au cours du stockage, c'est-à-dire lorsque le film plastique est endommagé, de l'oxygène pénètre dans le fourrage entraînant la croissance d'espèces fongiques et bactériennes et donc une détérioration de la qualité nutritive et sanitaire du produit. Les ensilages ou enrubannés, avec leur haut niveau d'acides organiques et de dioxyde de carbone et leur faible niveau d'oxygène, constituent un substrat idéal pour *Penicillium roqueforti* (Samson *et al.*, 2002) qui, par conséquent, est l'espèce la plus représentée dans ce type de fourrage (Skaar, 1996 ; Auerbach *et al.*, 1998 ; O'Brien *et al.*, 2005). Depuis peu, *Penicillium roqueforti* est considéré comme un groupe renfermant en fait trois espèces différentes, à savoir *Penicillium roqueforti*, *P. paneum* et *P. carneum* (Boysen *et al.*, 1996). Dans les enrubannés produits expérimentalement en 2007 et 2008, aucune de ces espèces n'a été détectée dans les poussières issues des fourrages (*Chapitre I et II*). Seul *Penicillium roqueforti* a été identifiée dans le haylage Gr et le haylage Lm où il représentait respectivement 36 et 40 % des UFCs totales (*Chapitre III*).

Penicillium roqueforti est potentiellement toxigène. Il peut produire différentes mycotoxines dans des ensilages ou enrubannages moisissés, comme la roquefortine C, l'andrastine A, l'acide mycophénolique et de la toxine PR (Frisvad *et al.*, 2004). O'Brien *et al.* (2006) ont mis

en évidence la présence de roquefortine C, d'acide mycophénolique et d'andrastine A dans des ensilages en balle ronde largement contaminés par des organismes fongiques. Dans notre étude, la méthode multi-mycotoxines ne comprenait pas les mycotoxines produites par *Penicillium roqueforti*, nous ne pouvons donc pas vérifier si ces mycotoxines étaient présentes dans les fourrages contenant *Penicillium roqueforti* comme le haylage Lm, par exemple.

Les enrubannés sont également très contaminés par les pollens. Ce mode de conditionnement piège les grains de pollens dans la matrice. S'ils sont plus présents que dans un fourrage sec, ils sont moins mobiles puisque la matrice humide les retient et ils ne peuvent pas ou peu véhiculer dans l'air et pénétrer dans les voies respiratoires du cheval.

La différence entre les quantités de poussières et de pollens détectées dans les enrubannés, s'explique essentiellement par leur conditionnement stabilisant le taux d'humidité. La contamination fongique dépend, quant à elle, principalement de la qualité du stockage. Les conditions anaérobiques ne doivent pas être interrompues au cours du stockage car des espèces comme *Penicillium roqueforti* peuvent s'y développer et produire des mycotoxines.

III.2 Le mode de Séchage (*Chapitre I & II*)

Plusieurs modes de séchage du foin ont été expérimentés : i) une pratique usuelle des haras qui font appel à des entreprises agricoles, consistant à effectuer de façon tardive le premier fanage, environ 48 heures après la coupe ; ii) un nombre supérieur de fanage ; iii) un séchage en grange.

Le fanage réalisé 48 heures après la coupe, a eu un effet négatif sur la qualité sanitaire du foin. Lors de la première année d'expérimentation au champ, il a entraîné une augmentation de la contamination fongique. En 2008, seule la présence de zéaralénone à une valeur de 2,381 mg.kg⁻¹ dans le foin et inférieure à 0.2 ng.L⁻¹ dans les poussières aériennes, différenciait ce foin du témoin fané après la coupe qui ne présentait pas de contamination par les mycotoxines. Après la coupe, le foin est resté au contact d'un sol humide avec peu de circulation du vent, empêchant alors le bon déroulement de la dessiccation et favorisant le développement d'espèces fongiques caractéristiques du champ comme *Fusarium*. Ces conditions peuvent alors expliquer la présence de zéaralénone dans ces fourrages.

Un nombre de fanage plus important pourrait, à l'inverse d'un fanage tardif, permettre d'accélérer le séchage et donc de limiter la contamination fongique mais il pourrait également, d'après Vignau-Loustau & Huyghe (2008), entraîner une augmentation des pertes de MS par la mécanisation et, par conséquent, une augmentation potentielle des poussières. Ces hypothèses n'ont pas été vérifiées dans notre expérimentation puisque ce traitement ne s'est différencié du témoin ni sur la base de la quantité de poussières ni sur la base de la contamination fongique.

Enfin, l'utilisation d'un séchage en grange permet de réduire le temps de séchage au champ car le foin est récolté à un taux de MS compris entre 65 et 70 % MS ce qui pourrait ainsi limiter le développement d'organismes fongiques. Cette technique permet d'éviter le blanchiment du foin par le soleil, le lessivage par la pluie et la rosée et la manipulation du foin lorsqu'il est sec et cassant (85 % MS) et, par conséquent de réduire les pertes de MS et de valeurs alimentaires (Guertin, 1991). D'après nos résultats, l'utilisation d'un séchage en grange n'a pas modifié la valeur alimentaire et en particulier les teneurs en cellulose et en protéines brutes du foin par rapport à au foin témoin séché au champ (*Chapitre II*). Cette technique présente également un avantage dans les régions où les conditions climatiques ne permettent pas toujours d'aboutir à un foin suffisamment sec (85 % MS) au pressage.

Dalphin *et al.* (1991) ont constaté une réduction significative du nombre d'actinomycètes dans le foin séché en grange en vrac, avec ou sans ventilation à air chaud, et à l'inverse une augmentation des micromycètes dans les foins séchés en grange notamment pour ceux qui ont une ventilation à air chaud. Lors de la 1^{ère} année d'expérimentation au champ, le séchage en grange comportant un générateur d'air chaud (25 °C) et un déshumidificateur, du foin en vrac, a entraîné une augmentation des poussières d'environ 24 % comparée au témoin et une tendance, non significative, vers une réduction de la contamination fongique. L'augmentation des poussières peut résulter d'un séchage trop important qui a entraîné une cassure des parties végétales et donc une perte de MS et une prolifération de la poussière. Cette tendance a été confirmée en 2008 par une réduction significative d'environ 98 % des moisissures grâce à l'utilisation du séchage en grange, se révélant ainsi plus efficace puisqu'il n'a pas engendré d'augmentation du contenu en poussières par rapport au témoin. La différence entre les deux années peut à nouveau être attribuée à des différences de conditions météorologiques ayant conduit à des qualités de matière fraîche très différentes.

Le mode de séchage influence la qualité sanitaire des fourrages et plus particulièrement la présence des organismes fongiques. Un fanage tardif entraîne une prolifération fongique et une contamination par des mycotoxines alors qu'une augmentation du nombre de fanages n'a pas d'effet significatif sur la qualité sanitaire. L'utilisation d'un séchage en grange peut permettre de réduire la prolifération fongique au cours du stockage grâce à l'utilisation combinée d'une ventilation à air chaud et d'un dés-humidificateur.

III.3 Les additifs de conservation (*Chapitre II*)

Tout comme le séchage en grange, l'utilisation d'additifs constitue une solution d'amélioration de la qualité sanitaire, mais aussi nutritive, lorsque les conditions ne permettent de sécher correctement le foin. C'est une méthode toutefois très peu développée, restant encore très expérimentale pour le foin. La majorité des études montrant l'efficacité des additifs de conservation sur les fourrages concernent essentiellement les ensilages. Les additifs ont été développés, en premier lieu, pour réduire la détérioration de la valeur alimentaire et sanitaire des ensilages lorsqu'ils étaient exposés à l'oxygène mais également pour limiter les effets négatifs potentiels sur la performance animale (Bolsen *et al.*, 1992 ; Emanuele *et al.*, 1992 ; Kung *et al.*, 1998 ; Hassanat *et al.*, 2007).

Pour le foin, l'additif le plus utilisé est l'acide propionique qui est plus efficace que des inoculums bactériens ou l'apport de sels (Duchaine *et al.*, 1995 ; Roussel *et al.*, 2005). Baron et Greer (1988) ont comparé plusieurs additifs (culture bactérienne vivante, acide propionique, sulfate de sodium, acide lactique, ...) vis-à-vis de leur capacité à prévenir la détérioration de la matière organique digestible *in vitro* (MODIV), l'échauffement et la croissance des moisissures, ainsi que la perte de matière organique. Il s'est avéré que les additifs comportant de l'acide propionique permettaient, de maintenir la MODIV élevée à des taux d'humidité de 25 % ou plus et d'entraver la croissance des bactéries et moisissures. De même Reboux *et al.* (2001) ont montré que l'utilisation d'acide propionique tamponné permettait de réduire la prolifération fongique de 40 %. Nos résultats corroborent ces derniers. Une réduction significative des moisissures d'environ 88 % a été obtenue ainsi qu'une diminution de 47 % des poussières dans le foin récolté à 75 % MS additionné d'acide propionique tamponné. Tout comme Reboux *et al.* (2001), nous avons observé une réduction significative des UFC d'*Eurotium amstelodami* dans ce même foin. Cependant lorsqu'il est pressé à 85 % MS, l'ajout d'acide propionique ne modifie pas la qualité

sanitaire. Aucune différence de valeur nutritive entre les foins ayant reçu de l'acide propionique et leurs témoins n'a été détectée.

Peu d'études montrent l'efficacité des inoculums bactériens sur le foin. Baron et Greer (1998) n'ont pas observé de différence entre le foin 'témoin' et ceux ayant reçu des cultures de bactéries vivantes ou un apport d'acide lactique. Aucun effet d'amélioration de la qualité sanitaire des foins ayant reçu des bactéries lactiques (*Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788) n'a été observé sauf dans le cas du foin récolté à 85 % MS pour lequel l'ajout de bactéries lactiques a permis de réduire la quantité de poussières (*Chapitre II*). A l'inverse, une augmentation de la prolifération fongique ainsi que de la quantité de poussières a été observée pour le foin récolté à 75 % MS avec des bactéries lactiques. Selon Duchaine *et al.* (1995) qui ont testé l'inoculum bactérien, *Pediococcus pentosaceus*, il faut que le foin ait un taux d'humidité de 35 % pour permettre un taux de croissance bactérienne élevé. A des taux d'humidité inférieurs, ces auteurs n'ont remarqué aucune croissance de l'inoculant et donc aucune amélioration de la qualité des fourrages testés. Ces résultats peuvent expliquer ceux qui ont été obtenus pour les foins récoltés à 75 % MS avec des bactéries lactiques (*Chapitre II*). La deuxième hypothèse qui peut être retenue pour expliquer ce résultat, réside dans le fait que le délai d'action des bactéries sur la prolifération fongique est probablement plus long (croissance puis production d'acide lactique) que celui nécessité par un apport d'acide propionique. C'est en effet un adjuvant commercialisé dans un but de conservation et donc avec un mode d'action à long terme. Ceci peut être corroboré par des données (non présentées) que nous avons obtenues, montrant après 7 mois de stockage en présence de bactéries lactiques, une réduction significative de la contamination fongique par rapport au même foin analysé après seulement 1 mois de stockage.

L'acide propionique permet de réduire la croissance des moisissures lorsque le foin est récolté à moins de 75 % MS. L'utilisation de bactéries lactiques, quant à elle, reste à approfondir, un taux d'humidité élevé à la récolte ainsi que le temps de stockage contribuant à augmenter leur efficacité sur la prolifération fongique.

III.4 Les conditions météorologiques (*Chapitre I & II*)

L'effet des conditions climatiques au cours de la récolte a été testé à la fois en simulant une pluie avant ou après coupe.

Une pluie avant coupe conditionne faiblement la qualité sanitaire des foins. Seule une augmentation du contenu en poussière a été observée lors de la récolte tardive de 2008. Ce résultat confirme alors que les conditions météorologiques et plus précisément la pluviométrie, avant la fauche, influence peu la qualité sanitaire des fourrages. A l'inverse, une pluie après coupe présente de nombreux effets défavorables pour la qualité sanitaire des fourrages. En 2007 la simulation d'une pluie après coupe a abouti à une augmentation des poussières de 71 %, des organismes fongiques de 99 % (en particulier d'espèces potentiellement toxigènes, allergènes ou pathogènes), des mycotoxines, des endotoxines ainsi qu'une augmentation de la contamination par le sol de 52 %. L'étude des effets d'une pluie après coupe semble corroborer les travaux de Terho *et al.* (1987) et de Ward & Couëtil (2005). En effet, nos résultats décrivent, suite à une pluie, un développement fongique plus important notamment en ce qui concerne *Aspergillus fumigatus*, l'une des espèces incriminées dans la MORVR.

Aspergillus fumigatus et *Aspergillus niger*, espèces potentiellement toxigènes, se sont également développés sur ces foins. *Aspergillus fumigatus* peut produire plusieurs mycotoxines comme la gliotoxine. Cette dernière peut provoquer de graves conséquences chez l'animal puisque des cas de mortalité après ingestion de foins contaminés par cette mycotoxine ont été enregistrés chez des chameaux (Gareis & Wernery, 1994). De plus, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus niger*, avec *Emmericella 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 (Cook *et al.*, 1968 ; Guillot *et al.*, 1996).

En 2007, la zéaralénone (ZEA) et l'alternariol ont été détectés dans ces foins à des concentrations allant de 14 à 89 mg.kg⁻¹ de foin pour la zéaralénone et de 0.6 mg.kg⁻¹ de foin pour l'alternariol. Quelques études font part de la présence de zéaralénone dans le foin (Coulombe, 1993 ; Osweiler, 1996 ; Buckley *et al.*, 2007). A l'inverse, aucune étude ne montre la présence d'alternariol dans le foin et son effet sur les chevaux.

En 2008, le seul effet défavorable de la pluie après coupe a été la présence de zéaralénone dans une des bottes de ces foins à une concentration de 0.26 mg.kg⁻¹ de foin. Aucune des espèces produisant cette mycotoxine n'a été identifiée et ceci, probablement parce que les *Fusaria* et *Alternaria* sont des genres principalement identifiés au champ et non dans les foins (Scudamore & Livesey, 1998 ; Boudra *et al.*, 2002). Les niveaux d'endotoxines étaient également très élevés en

2007. Ces foins présentaient entre $1.875.10^6$ à $1.875.10^8$ UI.g⁻¹ de foin contre $1.875.10^4$ à $1.875.10^5$ UI.g⁻¹ de foin pour le témoin.

Au cours de l'année 2007, la pluviométrie a été particulièrement importante. Il est tombé 340 mm de pluie de mai à juillet au lieu de 180 mm en moyenne et en 2008, seulement 110 mm. Les effets de la pluie près coupe ont alors été accentués par les conditions météorologiques défavorables de 2007 par rapport à 2008. La contamination des foins par le sol a également été accentuée suite à la pluie après coupe. Le sol de la prairie étant très humide, le passage des engins agricoles a détérioré la parcelle et accentué la contamination du foin par le sol. A l'inverse, une diminution de la quantité de pollens a été observée provenant certainement du lessivage des grains de pollen par les pluies successives.

Les conditions climatiques et plus particulièrement la pluviométrie, après la fauche conditionnent donc très largement la qualité sanitaire des fourrages à l'inverse des conditions météorologiques avant la fauche.

III.5 La période de coupe (*Chapitre I et II*)

Les foins produits de manière précoce ou tardive, mais également la coupe de regain se distinguent par leur qualité nutritive et sanitaire. La période de coupe conditionne essentiellement la quantité de pollens et la contamination par le sol des fourrages alors que la première et la seconde coupe diffèrent par la majorité des critères d'évaluation utilisés.

La valeur nutritive est réduite lorsque la fauche est tardive. La masse minérale ainsi que la teneur en protéines brutes des foins produits en Juillet, sont inférieures à celles observées pour les foins récoltés en Juin.

Du point de vue de la qualité sanitaire, les résultats sont mitigés. Une récolte tardive (Juillet) a permis une diminution de la contamination par le sol des foins, d'environ 24 % en 2007 et de 72 % en 2008 par rapport aux foins récoltés précocement (Juin). Par contre, une augmentation du contenu en pollens a été observée entre ces deux périodes de récolte. La libération du pollen par les plantes prairiales, qu'il s'agisse de *Poaceae* ou de dicotylédones a lieu sur une large période couvrant le printemps et l'été ; toutefois, le pic de pollen a lieu au début de l'été. Cependant la quantité de pollens dans les foins est beaucoup plus importante en fauche tardive

après ce pic de libération de pollen qu'au début de la floraison en juin. La quantité de pollens dans les foins récoltés tardivement en 2007 est nettement inférieure à celle de 2008. Il faut noter que, la récolte était beaucoup plus tardive en 2007 et avait donc lieu bien après la libération de grandes quantités de pollen et d'autre part, c'est certainement aussi la conséquence d'un lessivage engendré par les pluies successives du mois de Juillet 2007. Les foins récoltés en seconde coupe, à la fin de l'été sont très peu contaminés par du pollen puisque la réduction par rapport au témoin est de l'ordre de 95% en 2007 et de 74% en 2008.

Les foins récoltés en seconde coupe sont issus de la parcelle 'témoin' de la récolte précoce. Les foins récoltés sur une même parcelle en première coupe ou en regain sont contrastés. Ils se différencient en premier lieu par leur valeur alimentaire. Les foins récoltés en seconde coupe présentent des teneurs en cellulose brute réduites en comparaison des foins récoltés en première coupe (*Chapitre II*), ce qui peut s'expliquer par une plus forte proportion de feuilles que de tiges. Les feuilles contiennent un grand nombre de constituants intracellulaires très digestibles et possèdent une excellente valeur nutritionnelle (Drogoul *et al.*, 2004). Au niveau sanitaire, les résultats dépendent de l'année d'expérimentation : lors de la première année d'expérimentation, une augmentation significative de la production de poussières a été mesurée pour la seconde coupe, alors qu'en 2008, la seconde coupe permet une réduction de la quantité de poussières ainsi que des organismes fongiques. Tout comme Roussel *et al.* (2004) l'avaient observé, la production de foin en seconde coupe permet une réduction significative (99.7 % de moins que le témoin) des UFC d'*Eurotium amstelodami*. La diversité fongique s'est montrée plus élevée dans les regains de 2008. *Fusarium culmorum*, par exemple, qui peut produire dans certaines conditions des mycotoxines comme la zéaralénone, a été exclusivement identifiée dans les regains. Cette espèce affiliée aux champs a pu être favorisée par les pluviométries du mois d'août (71.5 mm) par rapport aux mois de Juin (12 mm) et Juillet (35 mm). Elle peut être à l'origine de la présence dans toutes les bottes de ce traitement, de zéaralénone avec des valeurs variant de 0,239 à 0,434 kg.mg⁻¹ de foin.

Une coupe précoce se distingue d'une coupe tardive par une meilleure qualité nutritive mais ne présente pas d'effet avéré sur la qualité sanitaire du foin. Les regains peuvent présenter des avantages vis-à-vis des autres foins. Leurs qualités nutritive et sanitaire sont similaires voire meilleures que les autres foins récoltés en première coupe. Toutefois, la présence de zéaralénone qui peut être la conséquence des pluies successives

du mois d'Août 2008 (*Chapitre II des résultats, Figure II-1*), incite à modérer cette conclusion.

III.6 Choix techniques : hauteur de coupe et intensité du pressage

La hauteur de coupe conditionne la qualité sanitaire des foins. Généralement la fauche est réalisée à 5 cm, ce qui représente une limite en deçà de laquelle la contamination des foins par le sol est importante et au delà de laquelle on aboutit à une perte de rendement. Une hauteur de coupe supérieure, en favorisant un séchage trop rapide, pourrait aussi entraîner une perte de MS. Une partie de ces hypothèses a été vérifiée au cours de la première année d'expérimentation. Les foins fauchés à 3 cm présentaient une augmentation du contenu en poussières d'environ 24 % par rapport au foin témoin fauché à 5 cm. La diversité fongique est accrue du fait d'un enrichissement par des espèces telles que *Stachybotrys chartarum* et *Phoma* spp qui sont telluriques comme l'indiquent Domsch *et al.* (1993), ou encore *Aspergillus fumigatus*. *Stachybotrys chartarum* peut produire de la satratoxine, la verrucarine et la roridine (Sorenson *et al.*, 1987) qui peuvent engendrer de graves stachybotryotoxicoses chez le cheval. La consommation de fourrages contaminés par ces mycotoxines peut entraîner chez le cheval des signes neurologiques, comme une perte de la vision, ou encore des hémorragies (Richard *et al.*, 2003).

Une fauche à 7 cm présente moins d'inconvénients, seule une augmentation du contenu en poussière a été observée, elle provient certainement d'une perte de matière sèche suite à un meilleur séchage comme l'on suggéré Vignau-Loustau & Huyghe (2008).

Comme déjà indiqué, l'intensité du pressage au moment du bottelage détermine également la qualité. Une augmentation de la quantité de poussières et de la contamination fongique a été observée suite à un pressage plus important des bottes de foin. La densité ayant augmentée, la circulation de l'air au sein de la botte était limitée, diminuant ainsi la vitesse de séchage au cours du stockage. L'humidité a alors favorisé le développement fongique et donc la production de poussières mais aussi le développement d'*Emericella nidulans* qui a été spécifiquement identifié dans ces foins. Tout comme *Aspergillus niger*, cette espèce est l'un des principaux agents causaux des mycoses dans les poches gutturales chez le cheval (Cook *et al.*, 1968 ; Guillot *et al.*, 1997).

Le choix d'une hauteur de coupe moyenne (5cm) et également d'un taux de pressage faible est donc primordiale pour la qualité sanitaire des fourrages, notamment pour limiter la contamination par le sol, par les organismes fongiques et plus particulièrement par les espèces fongiques potentiellement toxigènes ou pathogènes des foins.

III.7 Impact des perturbations d'origine animale : taupinières et pâturage des chevaux

Roussel *et al.* (2004) ont étudié l'effet de mauvaises conditions de récolte du foin sur certaines espèces fongiques incriminées dans la maladie des poumons du fermier (FLD), à savoir *Absidia (Mycocladus) corymbifera*, *Eurotium amstelodami* et *Wallemia sebi*. Sous les termes de 'conditions défavorables', ils se sont intéressés entre autres à la prolifération de campagnols qui provoquait une contamination du foin par le sol. Le développement de ces espèces fongiques, mis à part *Wallemia sebi*, étaient favorisées par ces conditions de récolte. Dans notre étude, ce n'est pas l'effet de la prolifération des campagnols qui a été testé mais celle des taupes par la mise en place de taupinières sur la parcelle. En 2007, aucun effet de la présence de taupinières ne s'est révélé significatif. En revanche, en 2008, la présence de taupinières a entraîné une augmentation significative de la contamination par le sol des poussières ainsi que la détection de traces de zéaralénone. La zéaralénone pourrait provenir d'espèces telluriques comme *Fusarium culmorum* et donc de la contamination par le sol des fourrages. Ni la quantité de poussières ni les organismes fongiques n'ont été sensibles à cette perturbation. La différence entre les 2 années résulte probablement de la date d'application des taupinières sur la parcelle, qui a été effectuée en mars pour la première année et en juin pour la seconde. Les pluies successives qui ont eu lieu en 2007, ont probablement réduit l'impact des taupinières.

La présence d'un pâturage préalable, simulée par des crottins de cheval, n'a influencé que la quantité de poussières qui a augmenté d'environ 41 % vis-à-vis du témoin et la présence d'*Aspergillus fumigatus*.

La présence de taupinières est donc à éviter sur les parcelles destinées à la production de foin afin de limiter la contamination des foins par le sol, par les organismes fongiques et notamment par les espèces fongiques telluriques potentiellement toxigènes comme les *Fusaria*. De même, un pâturage préalable de la

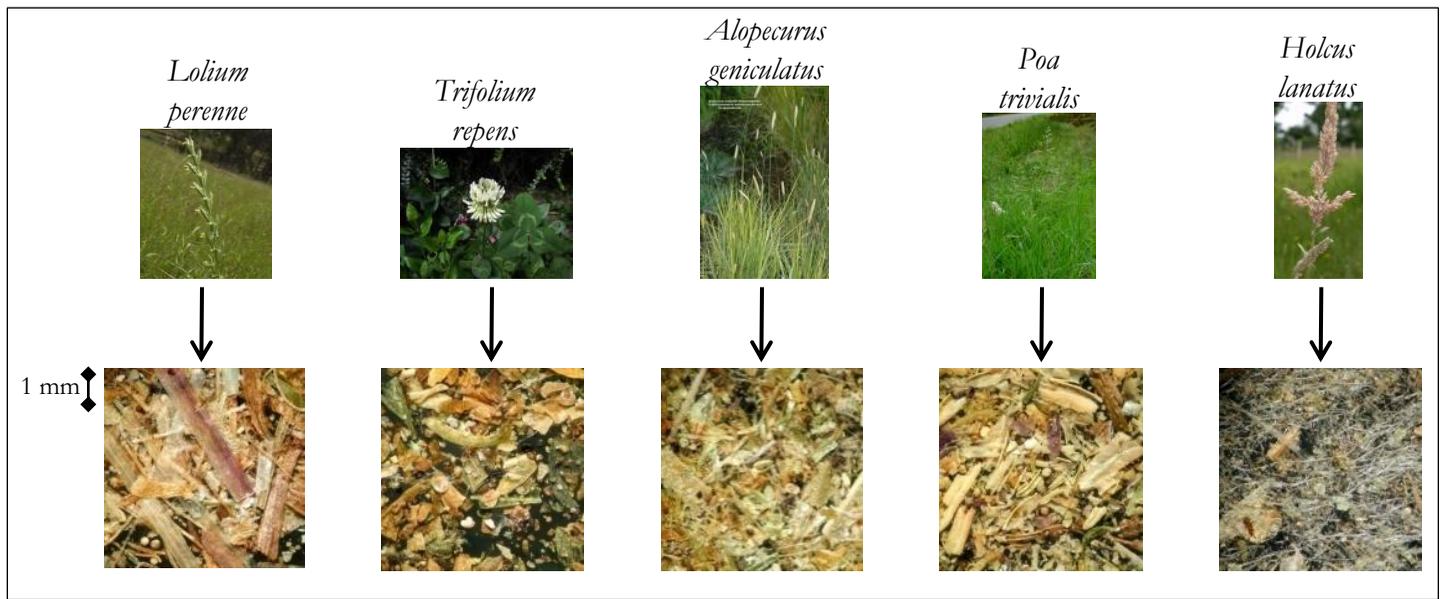


Figure 56 : Observations à la loupe binoculaire des poussières issues de foins monospécifiques de 5 espèces prairiales, *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, *Alopecurus geniculatus*, *Poa trivialis*, *Holcus lanatus*.

parcelle par des chevaux n'est pas à conseiller compte tenu de l'augmentation de la contamination par les poussières et par les espèces fongiques potentiellement toxigènes et incriminées dans la MORVR comme *Aspergillus fumigatus*.

IV. Effets de la composition floristique

Il est bien connu que la composition floristique d'une prairie influence la qualité nutritive du foin (Buchin *et al.*, 1999; Morel *et al.*, 2006). Au moyen de la troisième expérimentation (*Chapitre III*) visant à analyser des foins de diverses origines floristiques, nous avons voulu savoir si la composition floristique conditionnait également la qualité sanitaire.

L'analyse des foins mono-spécifiques a, tout d'abord, permis de montrer des disparités en termes de qualité nutritive. Le foin '*Trifolium repens*' est plus riche en constituants protéiques que les foins issus de *Poaceae* (Giovanni, 1988) et présente la plus faible teneur en cellulose brute. A l'inverse, *Alopecurus geniculatus* est à l'origine d'un foin particulièrement riche en cellulose.

Des différences en termes de qualité sanitaire ont également été observées. Les agriculteurs considèrent souvent que la houlque laineuse (*Holcus lanatus*) est une espèce à éviter au sein de la parcelle car elle produit beaucoup de poussières. Notre étude a confirmé cette hypothèse basée sur des observations de terrain. La houlque occasionne en effet la plus forte production de poussières mais la plus faible contamination fongique. Ceci peut s'expliquer notamment par la morphologie des espèces prairiales comme par exemple la forte pilosité foliaire de la houlque. L'observation des poussières à la loupe binoculaire (Figure 56) de ces foins mono-spécifiques, nous a permis de constater que leurs compositions étaient différentes et que celle de la houlque était effectivement dominée par des poils très fins.

Les espèces végétales présentent des aptitudes différentes à la dessiccation. Les *Fabaceae* ayant une meilleure capacité de séchage, devraient donc être moins contaminés par les organismes fongiques. Cependant, dans notre étude, il s'est avéré que *Trifolium repens* ne se différenciait pas de la plupart des *Poaceae* en terme de contamination fongique. En effet, seul le foin mono-spécifique 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 *Holcus lanatus* ou encore, *Aspergillus terreus*, identifié uniquement dans le foin d'*Alopecurus geniculatus*. Des études ont montré l'existence de relations étroites entre espèces végétales et

espèces fongiques comme, par exemple, les champignons symbiotiques (Ellis & 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. Deux enrubannés (Haylage Gr et Lm) et deux foins (Foin de Crau et Foin de type Suisse) ont été choisis. Des différences de valeur alimentaire ont tout d'abord été mises en évidence. Les enrubannés présentaient une valeur nutritive similaire ou supérieure aux foins comme l'avaient aussi montré Demarquilly *et al.* (1998).

Les deux enrubannés, se sont révélés de qualité différente. Leur différence réside principalement dans leur taux d'humidité, leur qualité de stockage ainsi que dans leur composition floristique.

Les foins commerciaux présentent tous une meilleure qualité sanitaire que notre foin produit expérimentalement en 2008. Ils contiennent peu de poussières, d'organismes fongiques, d'endotoxines et de pollens et aucune mycotoxine parmi celles qui ont été recherchées.

Des relations entre les foins mono-spécifiques et les foins commerciaux ont été mises en évidence. 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 mono-spécifique étaient également identifiées dans un foin commercial contenant cette espèce végétale. C'est le cas du genre *Rhizomucor* identifié dans les foins d'*Alopecurus geniculatus* et *Trifolium repens* mais aussi dans le foin de mélange de semences typiques de Suisse, qui contenait ces deux espèces végétales.

L'analyse des foins mono-spécifiques et plurispécifiques confirme donc l'impact de la composition floristique sur la qualité sanitaire. Il semble que les espèces prairiales à favoriser parmi celles que nous avons étudié, pour obtenir un foin de qualité aussi bien nutritive que sanitaire, sont *Trifolium repens*, *Lolium perenne* et *Poa trivialis*. Les foins commerciaux analysés ici sont de bonnes alternatives pour palier le problème des maladies pulmonaires équines car ils présentent peu de poussières et d'organismes fongiques qui sont les principaux agents de l'étiologie de la MORVR.

Tableau XVII : Tableau récapitulatif des effets des pratiques culturales et des conditions météorologiques sur les critères d'évaluation de la qualité sanitaire des fourrages. Les données utilisées sont issues des expérimentations décrites respectivement au sein des chapitres 1 et 2 des résultats. Les foins témoins n'ont subi aucun des traitements mentionnés. L'analyse statistique est réalisée en considérant le seuil de signification à 5%.

Traitements	UFCs	UFCs/10 ⁵ part.	<i>A. fumigatus</i>	Mycotoxines	Poussières respirables	Diversité fongique	Pollens	Contamination par le sol	Endotoxines
Enrubannage	--	--	-	+/-	---	=	++	++	+++
Séchage en grange	--	--	+	-	++	++	=	=	+++
Seconde coupe	--	=	-	+	+/-	++	---	=	nd
Récolte à 75 % MS + Acide propionique	=	=	-	-	---	=	=	=	--
Récolte à 85 % MS + Bactéries lactiques	=	=	+	-	---	=	=	=	++
Nombre de fanages supérieur	=	=	-	-	=	=	=	=	nd
Récolte à 85 % MS + Acide propionique	=	=	-	-	=	=	=	=	=
Taupinières	=	=	+	+	=	=	=	++	nd
Pluie avant coupe	=	=	-	-	++	=	=	=	-
Coupe à 7 cm	=	=	-	-	+++	=	=	=	nd
Crottins de cheval	=	=	+	-	+++	=	=	=	nd
Coupe à 3 cm	=	=	+	-	+++	+++	=	=	nd
Densité de pressage supérieure	+++	+++	+	-	=	=	---	+++	=
Fanage tardif	++	++	+	+	=	=	=	=	nd
Récolte à 75 % MS + Bactéries lactiques	+++	+++	-	+	+++	=	=	=	=
Récolte à 75 % MS	+++	++	+	+	+++	++	=	+/-	+++
Pluie après coupe	++	++	+/-	+/-	++	=	--	++	++

=: Pas de différence avec les foins témoins

-: Non présent

--: Diminution ou pas de différence par rapport aux foins témoins

---: Diminution par rapport aux foins témoins

+/-: Diminution (ou absence) ou augmentation (ou présence) par rapport aux foins témoins

+: Présent

++: Augmentation ou pas de différence par rapport aux foins témoins

+++ : Augmentation par rapport aux foins témoins

nd: Non déterminé

V. Qualité sanitaire & Qualité nutritive : Quelle relation ? (*Chapitre II & III*)

Dans les chapitres II et III, les analyses de valeurs sanitaires ont été couplées à des analyses de valeurs alimentaires. Des effets des pratiques culturales ou de la composition floristique ont été observés sur la qualité sanitaire et nutritive des foins. Toutefois, les fourrages présentant la meilleure qualité nutritive ne sont pas nécessairement ceux qui ont la meilleure qualité sanitaire et *vice versa*. Il s'agit par conséquent de trouver un compromis dans la production pour aboutir à un foin suffisamment énergétique et digeste mais également peu poussiéreux, peu contaminé par des spores fongiques, du sol et du pollen.

VI. Synthèse

Les 2 années d'expérimentations au champ ainsi que l'analyse des foins mono-spécifiques et des foins commerciaux, pourraient tout d'abord nous permettre d'assimiler ces fourrages à de véritables micro-écosystèmes où se développe une grande diversité biotique tant fongique (plus de cinquante espèces), bactérienne, ou animale (arthropodes essentiellement), reliée par des relations trophiques associant des producteurs primaires, des consommateurs primaires (fongiques et bactériens) en compétition (« guerre chimique » comme en atteste la présence d'endotoxines et de mycotoxines) et secondaires sensibles aux conditions environnementales locales (présence déterminante de l'eau). Ces fourrages et leurs contaminants aboutissent à des productions massives de poussières respirables (10^9 particules par m^3 et au delà) par voie mécanique ou biotique, au sein desquelles les spores fongiques contribuent pour quelques % (<0.5 %) et jusqu'à 87% dans les cas extrêmes.

A l'issue de ce travail, des propositions d'amélioration de la qualité sanitaire du fourrage équin se dessinent. Le tableau XVII synthétise les effets des facteurs testés sur la qualité sanitaire des fourrages produits expérimentalement en 2007 et 2008, et permet de définir les pratiques culturales à favoriser. L'étude des foins mono-spécifiques et commerciaux ont, quant à eux permis, de définir les espèces qui sont à favoriser dans les prairies, pour améliorer la qualité sanitaire et nutritive des fourrages.

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

pâturage préalable de cette parcelle par des chevaux et d'éliminer les taupinières. De plus, des conditions météorologiques sèches et venteuses au moment de la récolte favorisent une meilleure qualité sanitaire. La hauteur de coupe doit être de 5 cm environ et le foin doit être fané après la coupe, puis une à deux fois par jour selon la météorologie.

Les conditions ne permettent pas toujours de récolter un foin à 85 % MS. Dans ce cas il est conseillé d'utiliser un séchage en grange, alternativement des additifs de conservation comme l'acide propionique ou d'opter pour une production enrubannée. L'enrubannage devra être réalisé avec beaucoup de soin afin d'éviter la prolifération d'organismes fongiques potentiellement toxigènes dont le développement peut être favorisé par une augmentation de la pression partielle en oxygène. Une coupe des regains est aussi intéressante notamment pour la valeur alimentaire, un faible contenu en pollens et en UFCs mais 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 caractérisé par un mélange de semences prairiales Suisse intégrant *Festuca pratensis*, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens* et *Alopecurus geniculatus*.

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Le travail de recherche réalisé dans le cadre de cette thèse, a permis d'initier une nouvelle thématique au sein de l'UMR Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutrition N.C.S.. Il devait par ailleurs être pluridisciplinaire et reposait sur un partenariat avec le GRECAN, le Laboratoire Franck Duncombe et la station Expérimentale INRA du Pin-au-Haras. Les résultats obtenus soulèvent de nombreuses questions susceptibles d'alimenter des perspectives de recherche. Par ailleurs, s'agissant d'une contribution à la compréhension du déterminisme de la qualité sanitaire des fourrages destinés à l'alimentation équine, les approches choisies ont, parfois et par nécessité, été volontairement réductrices. Certaines contraintes ont pu limiter nos travaux. D'une part, nous n'avons pu effectuer que deux productions de foin durant ces travaux de thèse, en raison de la production annuelle du foin. D'autre part, nous n'avons pu établir de liens de causalité plus directs entre la qualité sanitaire du fourrage et le déclenchement de la MORVR, qui suppose une exposition récurrente et à long terme. Les perspectives qui découlent de ce travail, peuvent se situer à l'échelle de la recherche fondamentale ou bien encore à celle de la recherche - développement.

I. A une échelle fondamentale

Ce travail de thèse a soulevé le manque de **connaissances sur les mécanismes de production de poussières**. Durant les deux années d'expérimentations, il a été mis en évidence une corrélation entre la production de poussières et la contamination par des organismes fongiques ainsi que des relations très étroites entre espèces végétales et fongiques. Ce lien entre la production de poussières et la contamination fongique pourrait être dû aux organismes fongiques qui, avec leur arsenal enzymatique spécifique, détériorent les parois végétales pouvant ainsi engendrer plus ou moins de poussières. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en condition *in vitro* en ensemençant différentes espèces végétales avec différentes souches fongiques. Ce travail a débuté en collaboration avec le laboratoire de 'Glycobiologie et transports chez les végétaux' de l'Université de Rouen mais requiert des analyses supplémentaires. Les premiers résultats montrent déjà que la dégradation des parois végétales susceptibles d'être à l'origine de la majorité des poussières respirables, est réalisée de façon spécifique et avec des efficacités variables selon les organismes fongiques comme en atteste les profils glucidiques analysés. Déterminer quels organismes fongiques seuls ou en synergie, dégradent de la façon la plus efficace les parois végétales permettrait de déterminer plus précisément quelles espèces ont l'impact le plus délétère.

Par ailleurs, cela permettrait de mieux connaître les exigences écologiques de ces organismes fongiques pour ainsi mettre en évidence, ou non, des relations **spécifiques entre espèces végétales et fongiques** comme cela est connu pour les champignons symbiotiques, par exemple. En parallèle, une analyse plus détaillée des constituants de la poussière respirable provenant du fourrage, par exemple par microscopie électronique permettrait d'émettre des hypothèses quant à leur origine.

II. A l'échelle de recherche – développement

➤ L'une des principales critiques qui pourrait être faite à ce travail réside dans le fait que nous avons abordé les facteurs (pratiques culturales, composition végétale...) de façon dissociée. Cette approche ne permet pas de déterminer exactement quel est l'itinéraire technique optimal, ni la composition prairiale idéale, ni le potentiel d'amélioration de la qualité sanitaire si ces facteurs sont optimisés conjointement. La Normandie reste la principale région de production fourragère en France mais aussi l'une des principales pour l'élevage équin. Pourtant, force est de constater que la production régionale de foin si l'on en juge par les foins témoins que nous avons produits et analysés (*chapitres I & II des résultats*) ou encore les foins d'origine régionale que nous avons utilisés pour mettre au point nos méthodes d'analyse (*chapitre Matériels et Méthodes*), sont très loin d'atteindre les critères de qualité que nous avons obtenu, par exemple, pour le foin de Crau ou encore pour le foin issu d'un mélange commercial de semences suisses que nous avons produit localement. Il existe donc clairement des marges d'améliorations possibles parmi lesquelles la composition floristique de la prairie pourrait avoir un impact important. D'après le tableau XVII qui récapitule les effets des traitements sur la qualité sanitaire, il semble que certaines pratiques telles que le séchage en grange ou une seconde coupe tendent à améliorer la qualité sanitaire du fourrage. Il serait alors opportun de réaliser **une autre série d'expérimentations au champ au cours de laquelle i) seules les pratiques ayant permis d'améliorer la qualité sanitaire seront appliquées individuellement ou en interactions et ii) des prairies semées avec des compositions botaniques variables seront également utilisées**. De nouvelles mesures pourraient être intégrées car d'autres facteurs abiotiques comme le pH ainsi que la température interne des bottes durant le stockage peuvent également expliquer la composition myco-floristique. De plus, la présence de *Penicillium roqueforti* dans les enrubannages mais aussi de *Stachybotrys* dans certains fourrages, implique qu'il faudrait également **intégrer leurs mycotoxines dans la méthode d'analyse multi-mycotoxine**. Une méthode semi-quantitative de dosage des endotoxines a été utilisée au cours de ces travaux, il

faudrait alors également, mettre au point une méthode quantitative de détermination des endotoxines dans les fourrages.

➤ Parallèlement, l'étude de la variabilité de la qualité sanitaire du fourrage pourrait être étendue avec pour objectifs principaux de rechercher de nouvelles pratiques culturales ou des environnements prairiaux plus diversifiés. Une approche d'écologie *in situ* voire d'écologie du paysage pourrait être envisagée en intégrant les facteurs du milieu par la mise en place d'un **réseau d'exploitants agricoles**. L'analyse de parcelles (flore, sol, environnement) mais également des foins qui en découlent pourraient être envisagée. Ceci pourrait ensuite s'élargir à **d'autres régions de France** afin de tester les conditions météorologiques et les pratiques culturales qui sont parfois différentes d'une région à l'autre. Par exemple, les exploitants de la région de Crau qui possède une AOC pour leur foin, irriguent leur parcelle ce qui n'est pas couramment pratiqué en Normandie.

➤ Idéalement, il aurait été souhaitable de déterminer si la prévalence de la MORVR pouvait être associée à la qualité des fourrages distribués au sein de chaque exploitation. Nous avons exploré cette démarche notamment avec l'association des vétérinaires équins bas normands. Elle n'a pu être mise en place en raison de certaines difficultés à surmonter localement. Tout d'abord, le diagnostic de l'ensemble des cas de MORVR (cliniques et subcliniques) est extrêmement difficile à mettre en place puisque les méthodes associées relèvent plus des méthodes de la recherche que de la pratique vétérinaire. Secondairement, l'étiologie de la MORVR se caractérise par la nécessité d'une exposition récurrente et une sensibilisation des chevaux sur le long terme. On peut penser qu'un cheval sensibilisé, déclenchera une pathologie de type MORVR même avec un fourrage sec évalué comme étant de très bonne qualité sanitaire. Il n'en subsiste pas moins qu'une **étude régionale de la prévalence de la MORVR aurait tout son intérêt et pourrait reposer par exemple, sur une étude épidémiologique** comparable à celle qu'a menée Hotchkiss *et al* (2007), avec des améliorations possibles portant sur l'identification des cas cliniques et sub-cliniques de MORVR.

➤ Nous avons également conduit, en partenariat, avec des sociétés privées (Ecolit, Haylage.Biz, Biomin, Association du Foin de Crau) quelques essais préliminaires portant soit sur leur fourrage soit sur des additifs biologiques. Dans le premier cas, nous avons pu identifier des fourrages présentant des niveaux de contamination fongique atypique et potentiellement toxigène. **L'analyse complète du processus de production et de**

fabrication permettrait de corriger ce défaut de qualité. Dans le deuxième cas, il paraît évident que **l'apport d'additifs** (bactéries, acides, etc.) pourrait faire **l'objet de travaux complémentaires afin de maximiser leur efficacité.** En effet, il serait pertinent de faire varier la dose à appliquer mais également le moment d'application (juste après la fauche, après le premier et second fanage, juste avant le pressage comme cela a été fait pour cette étude) et ainsi comparer leur effet sur la qualité sanitaire. Enfin, si la qualité sanitaire s'avérait grandement améliorée, il serait nécessaire avant de recommander leur utilisation, de déterminer l'effet de ces additifs biologiques sur l'appétence des fourrages produits.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A**greste (2000) Statistiques Agricoles, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.
www.agreste.agriculture.gouv.fr
- Allen MS (1996) Relationship between forage quality and dairy cattle production. *Anim. Feed Sci. Tech.* **59**, 51-60.
- Amitani R, Taylor G, Elezis E, Llewellyn-Jones C, Mitchell J, Kuze F, Cole P, Wilson R (1995) Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect. Immun.* **63**, 3266-3271.
- Art T, McGorum BC, lekeux P (2002) Environmental control of respiratory disease. In: Lekeux P. (Ed.), *Equine Respiratory Disease*. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. Document N° B0334.0302.
- Art T, Franck T, Lekeux P, de Moffarts B, Couëtil L, Becker M, Kohnen S, Deby-Dupont G, Serteyn D (2006) Myeloperoxidase concentration in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and those with recurrent airway obstruction. *Can. J. Vet. Res.* **70**, 291-296.
- Arvalis (2003) *La Luzerne: culture et utilisation*. Co-édité par le Gnis, Arvalis (Institut du végétal) et l'Institut de l'élevage. pp.61.
- Ashworth LJ, McMeans JL, Brown CM (1969) Infection of cotton by *Aspergillus flavus*: the influences of temperature and aeration. *Phytopathology.* **59**, 669-673.
- Auerbach H, Oldenburg E, Weissbach F (1998) Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. *J. Sci. Food Agr.* **76**, 565-572.
- B**arnes PJ, Pedersen S (1993) Efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 51-526.
- Barnes PJ (1996) Mechanisms of corticosteroids in asthma. *Am. J. Respir. Care Med.* **154**, 521-527.
- Baron VS, Greer GG (1988) Comparison of six commercial hay preservatives under simulated storage conditions. *Can. J. Anim. Sci.* **68**, 1195-1207.
- Bateman GL, Murray G (2001) Seasonal variations in populations of *Fusarium* species in wheat-field soil. *Appl. Soil Ecol.* **18**, 117-128.

- Beech J, Merryman GS (1986)** Immunotherapy for equine respiratory disease. *Equine Vet. Sci.* **6**, 6-10.
- Beech J (1991)** Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Vet. Clin. N Am-Equine Pract.* **7**(1), 79-91.
- Benamou AE, Art T, Marlin DJ, Roberts CA, Lekeux P (1998)** Variations in systemic and pulmonary endothelin-1 in horses with recurrent airway obstruction (Heaves). *Pulm. Pharmacol. Ther.* **11**, 231-235.
- Bennett JW, Klich M (2003)** Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16** (3), 497-516.
- Benoît M, Saintôt D, Gaury F (1995)** Mesures en parcelles d'agriculteurs des pertes en nitrates. Variabilité sous divers systèmes de culture et modélisation de la qualité de l'eau d'un bassin d'alimentation. *C.R. Acad. Agric.*, **81**, 175-188.
- Berndt A, Derksen FJ, Robinson NE (2008)** Endotoxin concentration within the breathing zone of horses are higher in stables than on pasture. *Vet. J.* In Press.
- Bertrand Y, de Halleux G (2005)** *Chevaux et prairies*. Ed France Agricole, Paris (France). pp. 223.
- Billysson F (2002)** *A survey of the feeding of horses at riding schools in Southern Sweden* (in Swedish). BSc Thesis P 00/02:12. Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden.
- Blackman M, Moore-Colyer MJS (1998)** Hay for horses: the effects of three different wetting treatments on dust and nutrient content. *Anim. Sci.* **66**, 745- 750.
- Blyth W (1973)** Farmer's Lung Disease. In: G. Sykes and F.A. Skinner (Eds.), *Actinomycetales: Characteristics and practical importance*. Society for applied Bacteriology Symposium Series No.2. Academic Press, London, pp.261-276.
- Booth C (1966)** *The Genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K., pp. 237.
- Botton B, Breton A, Fèvre M, Gauthier S, Guy P, Larpent JP, Reymond P, Sanglier JJ, Vayssier Y, Veau P (1990)** *Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle*. Ed. Masson, Paris (France), pp. 512.
- Bouchet P, Guignard JL, Pouchus YF, Villard J (2005)** *Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée*. Ed. Masson, Paris (France), pp. 191.
- Boudra H, Morgavi DP, Galtier P, Michalet-Doreau B (2002)** Présence des moisissures toxigènes et des mycotoxines dans les fourrages conservés. Signification et prévention. *Renc. Rech. Ruminants.* **9**, 17-23.
- Boudra H, Morgavi DP (2005)** Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. *Anim. Feed Sci. Tech.* **120**, 113-123.

- Bowles KS, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS, Littlefield-Chabaud MA, Le Blanc C, Mistic L, Fermaglich D, Horohov DW (2002)** A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunop.* **87**, 385-389.
- Bolsen KK, Lin C, Brent BE (1992)** Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of *Alfalfa* and corn silages. *J. Dairy Sci.* **75**, 3066-3083.
- Boysen M, Skouboe P, Frisvad J, Rossen L (1996)** Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetics and biochemical profiles. *Microbiology.* **142**, 541-549.
- Bracher V, von Fellenberg R, Winder CN, Gruenig G, Hermann M (1991)** An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses. *Equine Vet. J.* **23** (2), 136-141.
- Bradstreet RB (1965)** *The Kjeldahl method for organic nitrogen*. Academic Press, New York.
- Brain JD, Valberg PA (1979)** Deposition of aerosol in the respiratory tract. *Amer. Rev. Resp. Disease.* **120**, 1325-1979.
- Braun-Blanquet J (1964)** *Pflanzensoziologie*, Springer, Wier, pp. 865.
- Broadstone RV, Scott JS, Derksen FJ, Robinson NE (1988)** Effects of atropine in ponies with recurrent airway obstruction. *J. Appl. Physiol.* **65**, 272-275.
- Broadstone RV, Leblanc PH, Derksen FJ, Robinson NE (1991)** In vitro responses of airway smooth muscle from horses with recurrent airway obstruction. *Pulm. Pharmacol.* **4**, 191-202.
- Buchin S, Delague V, Duboz G, Berdague J-L, Beuvier E, Pochet S, Grappin R (1998)** Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavor characteristics of a semi-hard cheese. *J. Dairy Sci.* **81**, 3097-3108.
- Buchin S, Martin B, Dupont D, Bornard A, Achilleos C (1999)** Influence of the composition of Alpine highland pasture on the chemical, rheological and sensory properties of cheese. *J. Dairy Res.* **66**, 579-588.
- Buckley T, Creighton A, Fogarty U (2007)** Analysis of Canadian and Irish forage, oats and commercially available equine concentrate feed for pathogenic fungi and mycotoxins. *Irish Vet. J.* **60** (4), 231-236.
- Burrell MH, Wood JLN, Whitwell KE, Chanter N, Mackintosh ME, Mumford JA (1996)** Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationship between disease and virus, bacteria and environment. *Vet. Res.* **139**, 308-313.
- Burrell MH (1985)** Endoscopic and virological observations on respiratory disease in a group of young thoroughbred horses in training. *Equine Vet. J.* **17** (2), 99-103.

- Bush RK, Prochnau JJ (2004)** *Alternaria*-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immun.* **113**, 227-234.
- C**ampbell AR, Swanson MC, Fernandez-Caldas E, Reed CE, May JJ, Pratt DS (1989) Aeroallergens in dairy barns near Cooperstown, New York and Rochester, Minnesota. *Am. Rev. Resp. Disease.* **140**, 317-320.
- Cargill C (1999)** *Reducing dust in horse stables and transporters*. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC), pp. 21.
- Caroff M, Karibian D (2003)** Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* **338** (23), 2431-2447.
- Castegnaro M, Pfohl-Leszkowicz A (2002)** Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animales et humaines. *La sécurité alimentaire du consommateur*. Moll & Moll (Eds), Lavoisier, Tec & doc.
- Cavalier-Smith T (2001)** What are Fungi? pp 3-37. In *Systematics and Evolution* (The Mycota, 7A). David J. McLaughlin (Author), Esther G. McLaughlin (Author), P.A. Lemke (Author), Publisher: Springer-Verlag Telos (October 2000) pp. 350.
- Cermak JP, Ross PA (1978)** Airborne dust concentrations associated with animal housing task. *Farm Building Progress.* **51**, 11-15.
- Chabasse D, Bouchara J-P (1997)** Emergence de nouveaux de champignons pathogènes en médecine. *Rev. Fr. Lab.* 291, 129-143.
- Chabchoub A, Landolsi F, Sadfi N, Bouratbine A, Ghorbel A (2001)** Recherche dans le sang des anticorps précipitants envers *Aspergillus fumigatus* et extraits totaux de foin moisi chez les chevaux atteints du syndrome hémorragie pulmonaire induit par l'effort. *Rev. Méd. Vét.* **152**, 617-622.
- Chamberlain AC (1967)** Deposition of particles to natural surface. *Airborne Microbes*. Cambridge University Press. 165-203.
- Cheeke PR (1995)** Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *J. Anim. Sci.* **73**, 909-918.
- Chisci G, Zanchi C (1981)** The influence of different tillage systems and different crops on soil losses on hilly silty-clayed soil. In Morgan RPC (Eds.) *Soil conservation: Problems and Perspectives*. Chichester, Wiley, pp. 211-217.
- Christensen CM, Kaufmann HH (1965)** Deterioration of stored grains by fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* **3**, 9-84.
- Clarke AF (1987)** Air hygiene and equine respiratory disease. *In Practice.* 196-204
- Clarke AF, Madelin T (1987)** Technique for assessing respiratory health hazards from hay and other source materials. *Equine Vet. J.* **19** (5), 442-447.

- Clarke AF (1992)** Chronic Obstructive Pulmonary Disease. In: *Current therapy in equine medicine n°3* (Robinson, N.E., Saunders Ed.) pp. 329-332. Philadelphia.
- 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.
- Cole RJ, Cox RH (1981)** *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. Academic Press, New York.
- Collins M, Algers B (1986)** Effects of stable dust on farm animals- A review. *Vet. Res. Commun.* **10**, 415-428.
- Cook WR, Campbell RSF, Dawson C (1968)** The pathology and aetiology of guttural pouch mycosis in the horse. *Vet. Rec.* **83**, 422-428.
- Couëtil LL, Ward MP (2003)** Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1444 cases (1990-1999). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **223**(11), 1645-1650.
- Coulombe RA (1993)** Symposium: Biological action of mycotoxins. *J Dairy Sci* **76**, 880-891.
- Coulon J-B, Priolo A (2002)** La qualité sensorielle des produits laitiers et de la viande dépend des fourrages consommés par les animaux. *INRA Prod. Anim.* **15** (5), 333-342.
- Coulon JB, Pradel P, Verdier I (1997)** Effect of forage conservation (hay or silage) on chemical composition of milk. *Ann Zootech.* **46**, 21-26.
- Courtecuisse R, Duhem B (2007)** *Guide des champignons de France et d'Europe*. Delachaux et Niestlé, Paris (France). pp. 480.
- Curtis L, Raymond S, Clarke A (1996)** Dust and ammonia in horse stalls with different ventilation rates and bedding. *Aerobiologia.* **12**, 239-247.

D

- Mello JPF, Porter JK, MacDonald AMC, Placinta CM (1997)** *Fusarium* mycotoxins. In **D'Mello JPF (Ed.)** *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. CRC Press, Boca Raton, FL, 287-301.
- Dalphin JC, Pernet D, Reboux G, Martinez J, Dubiez A, Barale T, Depierre A (1991)** Influence of mode of storage and drying of fodder on thermophilic actinomycete aerocontamination in dairy farms of the Doubs region of France. *Thorax.* **46**, 619-623.
- Demarquilly C, Dulphy JP, Andrieu JP (1998)** Valeur nutritive et alimentaire des fourrages selon les techniques de conservation : foin, ensilage, enrubannage. *Fourrages.* **155**, 349-369.

- Denning DW, O'Driscoll BR, Hogaboam CM, Bowyer P, Niven RM (2006)** The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Eur. Respir. J.* **27**, 615-626.
- Derksen FJ, Robinson NE, Armstrong PJ, Stick JA, Slocombe RF (1985a)** Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *J. Appl. Physiol.* **58**, 598-604.
- Derksen FJ, Scott JS, Miller DC, Slocombe RF, Robinson NE (1985b)** Broncho-alveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Resp. Dis.* **132**, 1066-1070.
- Derksen FJ, Brown CM, Sonea I, Darien BJ, Robinson NE (1989)** Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. *Equine Vet. J.* **21**, 23-26.
- Descoteaux S, Savoie P (2002)** Intensive forage conditioning applied after mowing: prototype development and drying experiments. *Can. Biosyst. Engin.* **44**, 2.15-2.21.
- Dewhurst RJ, Fisher WJ, Tweed JKS, Wilkins RJ (2003)** Comparaison of grass and legumes silages for milk production. 1. Production responses with different levels of concentrate. *J. Dairy Sci.* **86**, 2598-2611
- Diquélou S, Leconte D, Simon JC (2003)** Diversité floristique des prairies permanentes de Basse-Normandie (synthèse des travaux antérieurs). *Fourrages* **173**, 3-22
- Dixon PM, Nicholls JR, McPherson EA, Lawson GHK, Thomson JR, Pirie HW, Breeze RG (1982)** Chronic obstructive pulmonary disease anatomical cardiac studies. *Equine Vet. J.* **14**, 80.
- Dixon PM, Railton DI, McGorum BC (1995a)** Equine Pulmonary Disease: a case control study of 300 referred cases. Part 2: details of animals and of historical and clinical findings. *Equine Vet. J.* **27**, 422-427.
- Dixon PM, Railton DI, McGorum BC (1995b)** Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 4: treatments and re-examination findings. *Equine Vet. J.* **27**, 436-439
- Domsch KH, Grams W, Anderson T-H (1980)** *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press: London, U.K., pp. 859
- Domsch KH, Grams W, Anderson T-H (1993)** *Compendium of soil fungi*. Vol. I, II. reprint IHW Verlag, Eching, Germany, pp. 859 + 405
- Douwes J, Heederik D (1997)** Epidemiologic investigations of endotoxins. *Int. J. Occup. Environ. Health*; **3**(suppl): S26–31

- Drogoul C, Gadoud R, Joseph M-M, Jussiau R, Lisberney M-J, Mangeol B, Montméas L, Tarrit A (2004)** *Nutrition et alimentation des animaux d'élevage Tome 1*. Deuxième édition, Educagri éditions, Dijon (France), pp. 270
- Duchaine C, Lavoie MC, Cormier Y (1995)** Effects of a bacterial hay preservative (*Pediococcus pentosaceus*) on hay under experimental storage conditions. *Appl. Environ. Microb.* **61** (12), 4240-4243
- Ducharme NG, Fubini SL (1983)** Gastrointestinal complications associated with the use of atropine in horses. *JAVMA*. **182**, 229-231
- Dulphy JP (1987)** *Fenaïson: pertes au cours de récolte et de conservation. Les fourrages secs : récolte traitement, utilisation*. VXième journées du Grenier de Theix. **CRVZ INRA de Theix , 103-124**
- Duncan P, Foose TJ, Gordon IJ, Gakahu CG, Lloyd M (1990)** Comparative nutrient extraction from forages by grazing bovids and equids: a test of the nutritional model of equid/bovid competition and coexistence. *Oecologia*. **84**, 411-418.

E

- E.E.A., European Environment Agency (2005)** *The European Environment: state and outlook 2005. Part A. Integrated assessment*. European Environment Agency, ISBN: 92-9167-776-0.
- Ellis MB, Ellis JP (1985)** *Microfungi on land plants: an identification handbook*. London, Sydney. Croom Helm 868 pp.
- Emanuel DA, Wenzel FJ, Bowerman CI, Lawton BR (1964)** Farmer's lung. *Am. J Med.* **37**,392-401.
- Emanuele SM, Horton GMJ, Baldwin J (1992)** Effect of microbial inoculants on quality of *Alfalfa* hay baled at high moisture and lamb performance. *J. Dairy Sci.* **75**, 3084-3090.
- Emberlin JC (2000)** Chapter 74. Aerobiology. In: Busse WW, Holgate ST, editors. *Asthma and Rhiniris. Second ed.* Oxford, UK: Blackwell Science; 1101-1103.

F

- Fairbairn SM, Page CP, Lees P, Cunnigham FM (1993)** Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin. Exp. Allergy* **23**, 821-828.
- Finner MF (1966)** Harvesting and handling low-moisture silage. *Transactions of the ASAE*. **9**, 377-381.
- Fleming K, Hessel EF, Van den Weghe HFA (2008)** Generation of airborne particles from different bedding materials used for horse keeping. *J. Equine Vet. Sci.* **28** (7), 408-418.

- Fleurance G, Duncan P, Fritz H, Cabaret J, Gordon IJ (2005)** Importance of nutritional and anti-parasite strategies in the foraging decisions of horses: an experimental test. *Oikos*. **110**, 602-612.
- Forgacs J (1965)** In *Mycotoxins in feedstuffs*, ed Wogan GN MIT Press, Massachusetts, USA, 87-93.
- Franchini M, Gilli U, Akens MK, Fellenberg RV, Bracher V (1998)** The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet. Immunol. Immunop.* **66**, 53-65.
- Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA (2004)** Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* **49**, 201-241.
- Gams W (1995)** How natural should anamorph genera be? *Can. J. Bot.* **73** (51), 747-753.
- Gareis M, Wernery U (1994)** Determination of gliotoxin in samples associated with cases of intoxication in camels. *Mycot. Res.* **10**, 2-8.
- 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.
- Gerber H (1973)** Chronic Pulmonary Disease in the horses. *Equine Vet. J.* **5**, 26-32.
- Gillespie JR, Tyler WS (1969)** Chronic alveolar emphysema in the horse. *Adv. Vet. Sci.* **13**, 59-99
- Gimeno A, Quintanilla JA, (1983)** Analytical and mycological study of a natural outbreak of zearalenone mycotoxicosis in horses. *Proc Int Symp. Mycotoxins*. National Research Centre, Caire, Egypt. pp.387-392.
- Giovanni R (1988)** Valeur alimentaire des associations graminées/ Trèfle blanc. *INRA Prod. Anim.* **1** (3), 193-200.
- Herbe-actifs.org (2009)** *Herb'actifs N°1* ! Ed. Gnis pour les professionnels de l'élevage.
- Gray PR, Derksen FJ, Robinson NE, Carpenter-Reyo LJ, Johnson HG, Roth RA (1989)** The role of cyclooxygenase products in the acute airway obstruction and airway hyperreactivity of ponies with heaves. *Am. Rev. Resp. Dis.* **140**, 154-160.
- Gray PR, Derksen FJ, Broadstone RV, Robinson NE, Johnson HG, Olson NC (1992a)** Increased pulmonary production of immunoreactive 15-hydroxyeicosatetraenoic acid in an animal model of asthma. *Am. Rev. Resp. Dis.* **145**, 1092-1097.

- Gray PR, Derksen FJ, Robinson NE, Scolombe RF, Peters-Golden ML (1992b)** Epithelial strips: an alternative technique for examining arachidonate metabolism in equine tracheal epithelium. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* **6**, 29-36.
- Gray PR, Derksen FJ, Broadstone RV, Robinson NE, Peters-Golden ML (1992c)** Decreased airway mucosal prostaglandin E2 production during airway obstruction in an animal model of asthma. *Am. Rev. Resp. Dis.* **146**, 586-591.
- Greff-Mirguet G (2002)** Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. Etude bibliographique. *Cahiers de notes documentaires- Hygiène et sécurité du travail.* **187**, 73-85.
- Gregory PH, Lacey M.E (1968)** Mycological examination of dust from mouldy hay associated with Farmer's Lung Disease. *J. Gen. Microbiol.* **30**, 75-88.
- Gregory PH, Lacey ME, Festenstein GN, Skinner FA (1963)** Microbial and biochemical changes in hay associated with farmer's lung disease. *J. Gen. Microbiol.* **30**, 75.
- Guerre P (1998)** Principales Mycotoxicoses observées chez les ruminants. *Le point Vétérinaire.* **29**, 51-58.
- Guertin LA (1991)** *Le séchage des balles de foin denses à basse température.* Thèse, Département de Génie Rural, Collège Macdonald, Ste-Anne-de-Bellevue. 88 pages.
- Guida N, Mesplet M, Di Gennaro E, Digilio P, Moras EV (2005)** *Aspergillus fumigatus* in nasopharyngeal cavity of horses. *Rev. Iberoam. Micol.* **22** (3), 160-162.
- Guillot J, Ribot X, Cadore JL, Bornert G (1996).** L'aspergillose des poches gutturales des équidés. *Bulletins de la Soc. Vét. Prat. de France.* **80**, 141-162.
- Guillot J, Collobert C, Gueho E, Mialot M, Lagarde E (1997)** *Emericella nidulans* as an agent of guttural pouch mycosis in a horse. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**, 433-435.
- H**agler WMJr, Towers NR, Mirocha CJ, Eppley RM, Bryden WL (2001) Zearalenone: Mycotoxins or mycoestrogen? In B.A. Summerell, J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden & Burgess (Eds). *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium.* APS Press, St Paul, Minnesota. pp. 321-331.
- Hall JA, Hoyt D, Zuver C, Skinner MM, Schlipf JW (2006)** Rapid, multiwall colorimetric assay for measuring neutrophil chemoattractant activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with recurrent airway obstruction. *J. Vet. Diagn. Invest.* **18**, 257-263.
- Hapke EJ, Seal RME, Thomas GO, Hayes M, Meek JC, (1968)** Farmer's lung-a clinical, radiographic, functional, and serological correlation of acute and chronic stages. *Thorax.* **23**, 451-468.
- Haras Nationaux (2003)** www.haras-nationaux.fr

- Hassanat F, Mustafa AF, Seguin P (2007)** Effects of inoculation on ensiling characteristics, chemical composition and aerobic stability of regular and brown midrib millet silages. *Anim. Feed Sci. Tech.* **139**, 125-140.
- Hennerberg W, Stohmann F (1859)** Über das erhaltungs futter volljährigen rindviehs. *J. Landwirtsch.* **3**, 485-551.
- Henning JC, Wheaton HN (1993)** Making and storing hay. *University of Missouri Coop. Ext. serv.* G4575.
- Hill J (2007)** Impacts of nutritional technology on feeds offered to horses: a review of effects of processing on voluntary intake, digesta characteristics and feed utilization. *Anim. Feed Sci. Tech.* **138**, 92-117.
- Hintikka EL (1976)** Stachybotryotoxicosis as a veterinary problem. In JV Rodricks, CW Hesseltine & MA Mehlman (Eds.). *Mycotoxins in Humans and Animal Health*. Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois. 277-284.
- Hintikka E-L (1978)** Human stachybotryotoxicosis. In T. Wyllie and L. Morehouse (ed.), *Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicosis, vol. 3*. Marcel Dekker, New York, N.Y. pp. 87-89.
- Hnatyszyn M, Guais A (1986)** Les fourrages et l'éleveur. *Agriculture d'aujourd'hui*, Lavoisier, Paris, France. 440 pages.
- Holmquist S, Müller CE (2002)** Problems related to feeding forages to horses. In: *Proceedings of the XIII International Silage Conference*, Auchincruive, Scotland, UK, 11-13 September, pp. 152-153.
- Holzer M, Mayrhuber E, Danner H, Brown R (2003)** The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol.* **21** (6), 282-287.
- Honig H (1979)** Mechanical and respiration losses during pre-wilting of grass. In Thomas C (ed.) *Forage conservation in the 80's.*, British Grassland Society, Hurley, Berkshire, UK, pp. 201-204.
- Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB (1995)** Fungal Allergens. *Clin. Microbiol. Rev.* **8** (2), 161-179.
- Hotchkiss JW, Reid SWJ, Christley RM (2007)** A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 1: Horse demographic characteristics and management. *Equine Vet J* **39** (4), 294-300.
- Hotchkiss JW, Reid SW, Christley RM (2007)** A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.* **39**(4), 301-308.

Huyghe C, Bournoville R, Couteaudier Y, Duru M, Gensollen V, Lherm M, Peyraud J-L (2005) *Prairies et cultures fourragères en France entre logiques de production et enjeux territoriaux*. Ed. INRA, Paris, 202 pages.

Huyghe C (2006) La multifonctionnalité des prairies. *Prairies-Herbivores-territoires : quels enjeux ?* Académie d'Agriculture de France. Journée du 30 novembre 2006.

Illius AW, Gordon IJ (1993) Diet selection in mammalian herbivores: constraints and tactics. In: Hughes, R. N. (ed.), *Diet selection. An interdisciplinary approach to foraging behaviour*, pp. 157-181.

Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J (1990) Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*. **348**, 555-557.

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) (2005) *Endotoxines*. Fiche 089/V01. pp.12.

Jackson CA, Berney C, Jefcoat AM, Robinson NE (2000) Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Vet. J.* **32**, 432-438.

Jean-Blain C (2002) *Introduction à la nutrition des animaux domestiques*. Ed. Tec. et Doc., Paris, pp. 424.

Jones L (1979) The effect of stage of growth on the rate of drying of cut grass at 20 °C. *Grass and Forage Science*. **36**, 17-23.

Jones L, Prickett J (1981) The rate of water loss from cut grass of different species dried at 20 °C. *Grass and Forage Science*. **36**, 23-28.

Joubert P, Cordeau ME, Boyer A, Silversides DW, Lavoie JP (2002). Quantification of mRNA expression by peripheral neutrophils in an animal model of asthma. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **165**, A317.

Kaup FJ, Drommer W, Damsch S, Deegen E (1990) Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) II: pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Equine Vet. J.* **22**, 349-355.

Keller SE, Sullivan TM, Chirtel (1997) Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **19**, 305-309.

Kendall A, Brøjer J, Karlstam E, Pringle J (2008) Enilconazole treatment of horses with superficial *Aspergillus* spp. rhinitis. *J. Vet. Intern. Med.* **22** (5), 1239-1242.

- Kennedy SM, Christiani DC, Eisen EA, Wegman IA, Greaves IA, Olenchock SA, Ye TT, Lu PL (1987)** Cotton dust and endotoxin exposure-response relationship in cotton textile workers. *Am. Rev. Respir. Dis.* **135**, 194-200
- Kiffer E, Morelet M (1997)** *Les deutéromycètes, classification et clé d'identification générique*. Ed. INRA (Paris), pp. 306
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008)** *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi, 9e éd.* CABI Publishing, Wallingford (Royaume-Uni). pp. 640.
- Kirschvink N, Di Silvestro F, Sbaï I, Vandenput S, Art T, Roberts C, Lekeux P (2002)** The use of cardboard bedding material as part of an environmental control regime for heaves-affected horses: in vitro assessment of airborne dust and aeroallergen concentration and in vivo effects on lung function. *Vet. J.* **163**, 319-325.
- Klang DT, Kennedy BJ, Pathre SV, Mirocha CJ (1978)** Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors. *Cancer Res.* **38**, 3611.
- Klich MA (2002)** *Identification of Common Aspergillus Species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht, The Netherlands; pp. 116
- Kotimaa MH, Husman KH, Terho EO, Mustonen MH (1984)** Airborne molds and actinomycetes in the work environment of farmer's lung patients in Finland. *Scand. J. Work Environ. Health.* **10**, 115-119.
- Kramaric P, Nemeč A, Pavlica Z, Flezar M, Kern I (2004)** Clinical analysis of recurrent airway obstruction in horses. *Slov. Vet. Res.* **41**(1), 53-58.
- Krysinska-Traczyk E, Skorska C, Prazmo Z, Sitkowska J, Cholewa G, Dutkiewicz J (2004)** Exposure to airborne microorganisms, dust and endotoxin during flax scotching on farms. *Ann. Agric. Environ. Med.* **11**, 309-317.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der BB, Gustafsson JA (1998)** Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* **139**, 4252-4263.
- Kung LJr, Sheperd AC, Smagala AM, Endres KM, Bessett CA, Ranjit NK, Glancey JL (1998)** The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* **81**, 1322-1330.
- Kung LJr, Taylor CC, Lynch MP, Neylon JM (2003)** The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **86**, 336-343.
- Kurup VP, Shen HD, Banerjee B (2000)** Respiratory fungal allergy. *Microbes Infect.* **2**, 1101-1110.

- L**and CJ, Hult K, Fuchs R, Hagelberg S, Lundstrom H (1987) Tremorgenic mycotoxins from *Aspergillus fumigatus* as a possible occupational health problem in sawmills. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 787-790.
- Lanier C, Heutte N, Richard E, Bouchart V, Lebailly P, Garon D (2009)** Mycoflora and mycotoxin production in oilseed cakes during farm storage. *J. Agr. Food Chem.* **57** (4), 1640-1645
- Lappalainen S, Pasanen AL, Reiman M, Kalliokoski P (1998)** Serum IgG antibodies against *Wallemia sebi* and *Fusarium* species in Finnish farmers. *Ann. Allergy Asthma Immuno.* **81**, 585-592.
- Lavoie JP (1997)** Chronic obstructive pulmonary disease. In Robinson NE, editor. *Current therapy in equine veterinary medicine, vol. 4*. Philadelphia: WB Saunders; pp 431-435.
- Le Bars J (1977)** La stachybotryotoxicose : une mycotoxicose fatale due à *Stachybotrys atra*. *Rev. Méd. Vét.* **128** (1), 51-69.
- Leblanc P, Broadstone RV, Derksen FJ, Robinson NE (1991)** In vitro responses of distal airways in horses with heaves. *Am. J. Vet. Res.* **52**, 999-1003.
- Le Gall A, Faverdin P, Thomet P, Vérité R (2001)** Le pâturage en Nouvelle-Zélande : des idées pour les régions arrosées d'Europe. *Fourrages*, **166**, 137-163.
- Léguillette R, (2003)** Recurrent airway obstruction-heaves. *Vet. Clin.-Equine Pract.* **19**, 63-86.
- Lei MG, Morisson DC (1988)** Specific endotoxin lipopolysaccharide binding proteins on murine splenocytes. *J. Immunol.* **141**, 996-1005.
- Levin J, Bang FB (1968)** Clottable protein in *Limulus*: Its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Tromb. Diath. Haemorrh.* **19**, 186.
- Logrieco A, Bottalico A, Mulé G, Moretti A, Perrone G (2003)** Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur. J. Plant Pathol.* **109**, 645-667.
- Lowell FC (1990)** Observations on heaves. An asthma-like syndrome in the horse. *Allergy proc.* **11**, 147-150.
- Lundholm M, Palmgren U, Malmberg P (1986)** Exposure to endotoxin in the farm environment. *Am. J. Ind. Med.* **10**, 314-315.
- M**aggon KK, Gupta SK, Venkitasubramanian TA (1977) Biosynthesis of aflatoxins. *Bact. Rev.* **41**, 822-855.
- Mahmoudi M, Gershwin ME (2000)** Sick building syndrome. III. *Stachybotrys chartarum*. *J. Asthma*, **37** (2), 191-198.

- Mair TS, Derksen FJ (2000)** Chronic Obstructive Pulmonary Disease: a review. *Equine Vet. Educ.* **12**(1), 35-44.
- Mansmann RA, Osburn BI, Wheat JD (1975)** Chicken hypersensitivity pneumonitis in horses. *J. Am. Vet. Med. Asso.* **166**, 673-677.
- Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Coetzer JAW, Thiel PG, Van Der Lugt JJ (1988)** Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **55**, 197-203.
- Marasas WFO (1995)** Fumonisin: their implications for human and animal health. *Nat. Toxins.* **3**, 193-198.
- Marti E, Gerber H, Essich G, Oulehla J, Lazary S (1991)** The genetic basis of equine allergic diseases 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet. J.* **23**, 457-460.
- Marr KA, Lees P, Page CP, Cunningham FM (1998)** Inhaled leukotrienes cause bronchoconstriction and neutrophil accumulation in horses. *Res. Vet. Sci.* **64**, 219-224.
- Martin-Rosset W, Andrieu J, Vermorel M, Festin M (2006)** Routine methods for predicting the net energy and protein values of concentrates for horses in the UFC and MADC systems. *Livest. Sci.* **100**, 53-69.
- Martin-Rosset W (1990)** Bases du rationnement. In : W. Martin-Rosset Ed., *L'alimentation des chevaux*. INRA, Paris, 1990, pp. 232
- McGorum BC, Dixon PM, Halliwell REW (1993)** Response of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet. J.* **25**, 261-267.
- McGorum BC, Ellison J, Cullen RT (1998)** Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. *Equine Vet. J.* **30** (5), 430-434.
- McPherson EA, Lawson GHK, Murphy JR, Nicholson JM, Breeze RG, Pirie HM (1979)** Chronic Obstruction Pulmonary Disease (COPD): factors influencing the occurrence. *Equine Vet. J.* **11** (3), 167-171.
- McPherson EA, Lawson GHK, Murphy JR, Nicholson JM, Fraser JA, Breeze RG, Pirie HM (1978)** Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Identification of Affected Horses. *Equine Vet. J.* **10** (1), 47-53.
- Meerdink GL (2002)** Mycotoxins. *Clin. Tech. Equine Pract.* **1** (2), 89-93.
- Mertens DR (2002)** Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC International* **85** (6), 1217-1240.

- Michel O, Kips J, Duchateau J, Vertongen F, Robert L, Collet H, Pauwels R, Sergysels R (1996)** Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 1641-1646.
- Miller JD, ApSimon JW, Blackwell BA, Greenhalgh R, Taylor A (2001)** Deoxynivalenol: a 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance. In BA Summerell, JF Leslie, D Backhouse, WL Bryden & LW Burgess (ed.) *Fusarium*, Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St Paul, Minn. 310-319.
- Moore BR (1996)** Lower respiratory tract disease. *Vet. Clin. N. Am-Equine Pract.* **12**, 457-472.
- Moore-Colyer MJS (1996)** Effects of soaking hay fodder for horses on dust and mineral content. *Anim. Sci.* **63**, 337-342.
- Moreau C (1980)** Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, intérêt en industrie fromagère, mycotoxines. *Le lait*, **LX**, 254-271.
- 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.
- Morisson DC, Ryan JL (1979)** Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv. Immunol.* **28**, 293-434.
- Moulé Y, Jemmali M, Rousseau N (1976)** Mechanism of the inhibition of transcription by PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Chem. Biol. Interactions.* **Tome XIV**, 207-216.
- Moulé Y, Jemmali M, Darracq N (1978)** Inhibition of protein synthesis by PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *FEBS Lett.* **Tome LXXXVIII (2)** 341-344.
- Müller CE, Udén P (2007)** Preference of horses for grass conserved as hay, haylage or silage. *Anim Feed Sci. Tech.* **132**, 66-78
- N**akagawa-Yoshida K, Ando M, Etches RI, Dosman JA (1997) Fatal cases of farmer's lung in a Canadian family. Probable new antigens, *Penicillium brevicompactum* and *P. olivicolor*. *Chest.* **111**, 245-258.
- Naumann C, Bassler R (1988)** *Die chemische Untersuchung von Futtermitteln*. Band III: Methodenbuch. Verlag J. Naumann-Neudamm. Germany
- Naylor JM, Clark EG, Clayton HM (1992)** Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. *Can. Vet. J.* **33**, 591-598.
- Nelson PE, Desjardins AE, Plattner RD (1993)** Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 233-252.

- Nicholls JM (1978)** *A pathological study of chronic pulmonary disease in the horse* (PhD thesis). Glasgow, Scotland, *University of Glasgow*.
- Nieminen SM, Maki-Paakkanen J, Hirvonen MR, Roponen M, Von Wright A (2002)** Genotoxicity of gliotoxin, a secondary metabolite of *Aspergillus fumigatus*, in a battery of short-term test systems. *Mutat. Res.* **520**, 161-170.
- Noël MF, Brisebarre JJ (2006)** *Nos campagnes-d'hier et d'aujourd'hui, 1ère ed.* Ed. De Borée. pp. 226.
- Norme AFNOR, ISO 5984 (2002)** *Animal feedings stuffs_ Detremination of crude ash.* Int. Org. Stand. Genève, Switzerland.
- Norme AFNOR, EN ISO 6865 (2002)** *Détermination de la teneur en cellulose brute.*
- Norme AFNOR, NF V 04-407 (2002)** *Détermination de la teneur en azote total et calcul de la teneur en protéines.*
- Nyman G, Lindberg R, Wechner D, Bjork M, Kwart C, Persson SGB, Gustafsson H, Hedenstierna G (1991)** Pulmonary gas exchange correlated to clinical signs and lung pathology in horses with chronic bronchiolitis. *Equine Vet. J.* **23**, 253-260.
-  **O'Brien M, O'Kiely P, Forristal PD, Fuller H (2007)** Visible fungal growth on baled grass silage during the winter feeding season in Ireland and silage characteristics associated with the occurrence of fungi. *Anim. Feed Sci. Tech.* **139**, 234-256.
- O'Brien M, Nielsen KF, O'Kiely P, Forristal PD, Fuller HT, Frisvad JC (2006)** Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J. Agr. Food Chem.* **54** (24), 9268-9276.
- O'Brien M, O'Kiely P, Forristal PD, Fuller HT (2005)** Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**(2), 131-135.
- Olenchock SA, May JJ, Pratt DS, Morey PR, (1986)** Endotoxins in the agricultural environment. *Am. J. Ind. Med.* **10**, 323-324.
- Osweiler GD (1996)** Toxicology. In: *The five Minute Veterinary Consult.* Williams and Wilkins. pp. 409-432.
- Ouellet A-M, Lafrenière C (2005)** *Additifs et inhibiteurs de moisissures pour fourrages.* Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation. pp.38

- P**earson EG, Riebold TW (1989) Comparison of bronchodilators in alleviating clinical signs in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *JAVMA*. **194**, 1287-1291.
- Pfohl-Leszkowicz A (1999)** *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, ed. Tec & Doc.
- Picandet V, Léguillette R, Lavoie JP (2002)** Comparison of the effects of three corticosteroids in the treatment of horses affected by heaves. In: *Proceedings of the 20th Annual Medical Forum of the American College of Veterinary Internal Medicine*, Dallas, pp.771
- Pickrell J (1990)** Hazards in confinement housing: gases and dusts in confined animal houses for swine, poultry, horses and humans. *Vet. Hum. Toxicol.* **33**, 32-39.
- Pirie RS, Collie DDS, Dixon PM, McGorum BC (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 JI (1979)** *The Genus Penicillium and Its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press: London, U.K., pp. 634
- Pôle de Compétitivité Cheval (2006)** Conseil des chevaux, www.chevaux-normandie.com
- Priolo A, Micol D, Agabriel J (2001)** Effects of grass feeding systems on ruminant meat color and flavour. A review. *Anim. Res.* **50**, 185-200.
- Pusterla N, Holmberg TA, Lorenzo-Figueras M, Wong A, Wilson WD (2005)** *Acremonium strictum* pulmonary infection in a horse. *Vet Clin Path* **34** (4), 413-416.
- Q**uillien J-F (2000) *Les mycotoxines*. Projet européen Flair Flow Europe 4 n° QLK1-CT-2000, INRA. pp.23
- R**amade F (1993) *Dictionnaire encyclopédique de l'Ecologie et des Sciences de l'Environnement*. Ediscience internationale, Paris, 822 pages.
- Rand TG, Giles S, Flemming J, Miller JD, Puniani E (2005)** Inflammatory and cytotoxic responses in mouse lungs exposed to purified toxins from building isolated *Penicillium brevicompactum* Dierckx and *P. chrysogenum* Thom. *Toxicol. Sci.* **87**(1), 213-222.
- Raymond SL, Curtis EF, Clarke AF (1994)** Comparative dust challenges faced by horses when fed alfalfa cubes or hay. *Equine Pract.* **16** (10), 42-47.

- Raymond SL, Curtis EF, Winfield LM, Clarke AF (1997)** A comparison of respirable particles associated with various forage products for horses. *Equine Pract.- Resp. Disease* **19** (2), 23-26.
- Raymond SL, Smith TK, Swamy HVLN (2003)** Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorben. *J. Anim. Sci.* **81**, 2123-2130.
- Raymond SL, Smith TK, Swamy HVLN (2005)** Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, metabolism and indices of athletic performance of exercised horses. *J. Anim. Sci.* **83**, 1267-1273
- Reboux G, Millon L (2008)** Microorganismes environnementaux en milieu agricole. *Arch. Mal. Prof. Env.* **69**, 286-288.
- Reboux G, Dalphin JC, Polio JC, Millon L, Baverel J, Martinez J, Girard L, Piarroux R (2002)** Influence of buffered propionic acid on the development of microorganisms in hay. *Mycoses.* **45**, 184-187.
- Reboux G, Piarroux R, Mauny F, Madroszyk A, Millon L, Bardonnnet K, Dalphin J-C, (2001)** Role of molds in Farmer's Lung Disease in Eastern France. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **163**, 1534-1539.
- Reboux G, Reiman M, Roussel S, Taattola K, Million L, Dalphin JC, Piarroux R (2006)** Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour in Finnish and French farms. *Ann Agr Env Med* **13** (2), 267-273.
- Reille M (1990)** *Leçons de palynologie et d'analyse pollinique*. Eds. CNRS, Paris (France), pp. 206
- Renaud J (2002)** *Récolte des fourrages à travers les âges*. Eds. France agricole, pp. 416
- Renault-Miskovsky J, Petzold M (1989)** *Spores et pollen*. Ed. La Duraulie, Cabriès (France). pp. 360
- Richard JL, Payne GA, Desjardins AE, Maragos C, Norred WP, Pestka JJ, Phillips TD, van Egmond HP, Vardon PJ, Whitaker TB, Wood G (2003)** *Mycotoxins : risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Ed. Council for agricultural Science and Technology. Ames, Iowa, USA.
- Richard E, Heutte N, Sage L, Pottier D, Bouchart V, Lebailly P, Garon D (2007)** Toxinogenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 2420-2425.
- Richard E, Heutte N, Bouchart V, Garon D (2009)** Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Anim. Feed Sci. Tech.* **148**, 309-320.

- Richard JL, DeBey MC (1995)** Production of gliotoxin during the pathogenic state in turkey poult by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Mycopathologia*. **129**, 111-115.
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, FDi Padova (1994)** Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. **8**, 217-225.
- Robertson (1983)** Influence of harvesting and conservation practices on forage quality. *Can. J. Plant Sci.* **63** (4), 913-925.
- Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski MA, Buechner-Maxwell VA (1996)** The pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary disease in horses. *Brit. Vet. J.* **152**, 283-306.
- Robinson NE (1997)** Pathogenesis and management of airway Disease. *AAEP Proc.* **43**, 106-115.
- Robinson NE (2001)** Chairperson's introduction: International Workshop on Equine Chronic Airway Disease, Michigan State University, 16-18 June 2000. *Equine Vet. J.* **33**, 5-19.
- Robinson NE, Wilson MR (2001)** Evidence-based medicine applied to heaves. *In: Proceedings of the Second World Equine Airways Symposium and 19th Comparative Respiratory Society Meeting.* pp1-11.
- Roquebert M-F (1997)** *Les moisissures: nature, biologie et contamination.* Museum national d'Histoire Naturelle.
- Rosenberg N (2005)** Affections respiratoires non infectieuses professionnelles liées aux agents biologiques : Physiopathologie et réactions syndromiques. *INRS.* TR **35**, 235-244
- Rosenberg N (2006)** Affections respiratoires professionnelles non infectieuses dues aux agents biologiques: Secteurs agricole et agroalimentaire. *INRS.* TR **37**, 225-238.
- Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ (1996)** Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health.* **48**, 1-34.
- Roussel S, Reboux G, Dalphin J-C, Bardonnat K, Million L, Piarroux R (2004)** Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung. *Occup. Environ. Med.* **61** (1), e3.
- Roussel S, Reboux G, Dalphin JC, Pernet D, Laplante JJ, Millon L, Piarroux R (2005)** Farmer's lung disease and microbiological composition of hay: a case-control study. *Mycopathologia.* **160**, 273-279.

- Sabater-Vilar M, Nijmeijer S, Fink-Gremmels J (2003)** Genotoxicity assessment of five tremorgenic mycotoxins (fumitremorgen B, paxilline, penitrem A, verruculogen and verrucosidin) produced by molds isolated from fermented meats. *J. Food Protect.* **66**, 2123-2129.
- Sainsbury DWB (1981)** Ventilation and environment in relation to equine respiratory disease. *Equine Vet. J.* **13**, 167-170.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O (2002)** *Introduction to Food and Airborne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht, The Netherlands, pp. 389
- Samson RA, Frisvad JC (2004)** Penicillium Subgenus Penicillium: New Taxonomic Schemes, Mycotoxins and Other Extralites. Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht, The Netherlands, pp. 260
- Savoie P, Burgess LR, Knight AC, Mcgechan MB (1994)** Drying and physical characteristics of matted ryegrass. *Grass Forage Sci.* **49**, 257-263.
- Schmallenbach KH, Rahman I, Sasse HHL, Dixon PM, Halliwell REW, McGorum BC, Cramer R, Miller HRP (1998)** Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet. Immunol. Immunop.* **66**, 245-256.
- Schurg WA, Noon TN (1979)** Experimentally induced aflatoxicosis in mature horses fed naturally contaminated cotton products. *Proc. Sixth Equine Nutrition Physiol. Symp*, College Station, TX, pp.72-73.
- Schwarz FJ, Sliwinski H, Schuster M, Rosenberger E (2005)** Variation in the nutrient composition of different feedstuffs for horses. *Proc. of the Equine Nutrition Conference*, Hannover, Germany, 1-2 October. *Pferdeheilkunde* **21**, 9-10.
- Scott PM, Kennedy BPC (1976)** Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*. *J. Agric. Food Chem.* **Tome XXIV**, 865-868.
- Scott PM (1989)** The natural occurrence of trichothecenes. In VH Beasley (ed.) *Trichothecene mycotoxicosis: pathophysiological effects*. **Vol. I** CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Scudamore KA, Livesey CT (1998)** Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agric.* **77**, 1-17.
- Séguin V, Lemauviel-Lavenant S, Garon D, Bouchart V, Gallard Y, Blanchet B, Diquélou S, Personeni E, Gauduchon P, Ourry A (In press)** Effect of agricultural and environmental factors on the hay characteristics involved in equine respiratory disease. *Agr. Ecosyst. Environ.*

- Shannon CE, Weaver W (1949)** *The mathematical theory of communication*. Urbana IL: University of Illinois Press.
- Simon J-C, Leconte D, Vertes F, Le Meur D (1997)** Maîtrise de la pérennité du trèfle blanc dans les associations. *Fourrages*, **152**, 483-498.
- Skaar I (1996)** *Mycological survey and characterisation of the mycobiota of big bale grass silage in Norway*. Ph.D. thesis, Norwegian College of Veterinary Medicine, Norway, pp. 101
- Slack GJ, Puniani E, Frisvad JC, Samson RA, Miller JD (2009)** Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *Mycol. Res.* **113**, 480-490.
- Smid T, Heederik D, Mensink G, Houba R, Boleij JS (1992)** Exposure to dust, endotoxins, and fungi in the animal feed industry. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **53**, 362-368.
- Sokal RR, Rohlf FJ (2003)** *Biometry, 3rd edition*. W.H. Freeman Compagny, New York. pp. 887
- Sorenson WG, Frazer DG, Jarvis BB, Simpson J, Robinson VA (1987)** Trichothecene, mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*. *Appl. Environ. Microb.* **53**, 1370-1375.
- Spaan S, Wouters IM, Oosting I, Doekes G, Heederik D (2006)** Exposure to inhalable dust and endotoxins in agricultural industries. *J. Environ. Monitor.* **8**, 63-72.
- Sutton JD (1989)** Altering milk composition by feeding. *J. Dairy Sci.* **72**, 2801-2814.
- Takahashi T, Ohtsuka Y, Munakata M, Nasuhara Y, Kamachi-Satoh A, Homma Y, Kawakami Y (2002)** Occurrence of farmer's lung disease is relevant to meteorological conditions: A 20-year follow-up field survey analysis. *Am. J. Ind. Med.* **41**, 506-513.
- Terho EO, Heinonen OP, Lammi S, Laukkanen V (1987)** Incidence of clinically confirmed farmer's lung in Finland and its relation to meteorological factors. *Eur. J. Respir. Dis.* **152** (suppl), 47-56.
- Tesarowski DB, Viel L, McDonnel WN (1996)** Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. J. Vet. Res.* **57**, 1214-1219.
- Thaon I, Reboux G, Moulonguet S, Dalphin J-C (2007)** Les pneumopathies d'hypersensibilité en milieu professionnel. *Arch. Mal. Prof. Env.* **68**, 518-540
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S (2001)** *ADE-4 software v. 2000*. Université de Lyon 1, France

- Thomson JR, McPherson EA (1981)** Prophylactic effects of sodium cromoglycate on chronic obstructive pulmonary disease in the horse. *Equine Vet. J.* **13**, 243-246.
- Thomson JR, McPherson EA (1984)** Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet. J.* **16**, 35-38.
- Thurlbeck WM, Lowell FC (1964)** Heaves in horses. *Am. Rev. Resp. Dis.* **89**, 82-88.
- Touffet J (1982)** *Dictionnaire essentiel d'écologie*. Ouest France Ed. Rennes, France. 108 pages.
- Tremblay GM, Ferland C, Lapointe J-M, Vrins A, Lavoie JP, Cormier Y (1993)** Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Vet. J.* **25**, 194-197.
- Ueno Y (1983)** General toxicity. In Y. Ueno (ed.), *Trichothecenes-chemical, biological and toxicological aspects*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 135-146
- Ulmer AJ (1997)** Biochemistry and cell biology of endotoxins. *Int. J. Occup. Env. Heal.* **3**, 8s-17s.
- Upperman JS, Potoka DA, Zhang XR, Wong K, Zamora R, Ford HR (2003)** Mechanism of intestinal-derived fungal sepsis by gliotoxin, a fungal metabolite. *J. Pediatr. Surg.* **38**, 966-970.
- Van Erck E (2007)** Prévalence des maladies respiratoires chez des chevaux référés pour baisse de performance. In : *Proceeding 33ème JRE*, Haras Nationaux Ed., Paris, 8 mars 2007, pp. 81-87
- 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, Duvivier DH, 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.
- Verdier-Metz I, Coulon JB, Viallon C, Pradel P (2000)** Effet de la conservation du fourrage sur les caractéristiques physico-chimiques et sensorielles des fromages. *Renc. Rech. Rum.* **7** : 318.
- Vignau-Lousteau L, Huyghe C (2008)** *Stratégies fourragères Pâturage-Ensilage-Foin*. Editions France Agricole, Paris. pp. 336
- Volland-Franqueville M, Sabbah A (2004)** Allergie aux acariens chez le cheval domestique : Expérience d'un vétérinaire équin spécialisé dans le domaine de l'allergie = The

practitioner searches the mites in the horse' environment. *Eur. Annu. Allergy Clin. Immunol.* **36** (1) 6-8.

Von Arx JA (1981) *The Genus of Fungi Sporulating in Pure Culture*. Cramer: Vaduz, Germany, pp. 424

W

agener R.E, Davis ND, Diener UL (1980) Penitrem A and Roquefortine production by *Penicillium commune*. *Appl. Environ. Microb.* **39**, 882-887.

Wang Z, Yu M, Robinson NE, Broadstone RV, Leblanc PH, Derksen FJ (1992) Exogenous but not endogenous PGE₂ modulates pony tracheal smooth muscle contractions. *Pulm. Pharmacol.* **5**, 225-231.

Warcup JH (1950) The soil-plate method for isolation of fungi from soil. *Nature.* **166**, 117-118.

Ward MP, Couëtil LL (2005) Climatic and aeroallergen risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in horses. *Am. J. Vet. Res.* **66** (5), 818-824.

Ward PL, Wohlt JE, Katz SE (2001) Chemical, physical, and environmental properties of pelleted newspaper compared to wheat straw and wood shaving as bedding for horses. *J. Anim. Sci.* **79**, 1359-1369.

Waring P, Eichner RD, Mullbacher A (1988) The chemistry and biology the immunomodulating agent gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. *Med. Res. Rev.* **8**, 499-524.

Watson ED, Mair TS, Sweeney CR (1990) Immunoreactive prostaglandin production by equine monocytes and alveolar macrophages and concentrations of PGE₂ and PGF in bronchoalveolar lavage fluid. *Res. Vet. Sci.* **49**, 88-91.

Watson ED, Sweeney CR, Steensma KA (1992) Arachidonate metabolites in bronchoalveolar lavage fluid from horses with and without COPD. *Equine Vet. J.* **24**, 379-381.

Whitlow LW, Haglar WM (2002) Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs* **74**, 1-10.

Wilson TM, Ross PF, Rice LG, Osweiler GD, Nelson HA, Owens DL, Plattner RD, Reggiardo C, Noon TH, Pickrell JW (1990) Fumonisin B1 levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J. Vet. Diag. Invest.* **2**, 213-216

Winder NC, von Fellenberg R (1988) Chronic small airway disease in the horse: immunohistochemical evaluation of the lungs with mild, moderate and severe lesions. *Vet. Rec.* **122**, 181-183.

Winder NC (1987) Chronic small airway disease in the horse: Pathologic and immunohistochemical studies. *Inaugural dissertation, Zürich, Switzerland.*

Wittenberg KM, Undi M, Bossuyt C (1996) Establishing a feed value for moulded hay. *Anim. Feed Sci. Tech.* **60**, 301-310.

Wodehouse RP (1971) *Hayfever plants*. New York, Hafner Press. pp. 280

Woods PSA, Robinson NE, Swanson MC, Reed CE, Broadstone RV, Derksen FJ (1993) Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Vet. J.* **25**, 208-213.

Y

Yiannikouris A, Jouany J-P (2002) Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res.*, **51**, 81-99.

Yoshida K, Rennie RP, Etches RI, Congly H, Suga M, Ando M, Dosman JA (1996) Etiology of farmer's lung in Saskatchewan, Canada. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, A546.

Yu M, Wang Z, Robinson NE, Leblanc PH (1994a) Inhibitory nerve distribution and mediation of NANC relaxation by nitric oxide in horse airways. *J. Appl. Physiol.* **76**, 339-344.

Yu M, Wang Z, Robinson NE, Leblanc PH (1994b) Modulation of bronchial smooth muscle function in horses with heaves. *J. Appl. Physiol.* **77**, 2149-2154.

Z

Zinedine A, Soriana JM, Molto JC, Manes J (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 1-18.

LEXIQUE

LEXIQUE

- ✦ **Andain** : Herbe mise en rangée pour le pressage du foin, par exemple.
- ✦ **Cellule à gobelet (ou cellules caliciforme)** : Terme désignant des cellules épithéliales qui produisent et sécrètent des mucines qui sont des protéines donnant l'aspect visqueux au mucus.
- ✦ **Cellule de Clara (ou Pneumocytes de type 2)** : Terme désignant de grandes cellules qui tapissent l'intérieur des alvéoles pulmonaires qui sont des cavités contenant l'air à l'intérieur des poumons.
- ✦ **Conidie** : Terme désignant les spores de champignons permettant la reproduction asexuée.
- ✦ **Cytokine** : Terme désignant des hormones du système immunitaire libérées en réponse à une infection bactérienne, par exemple. Les plus connues sont les interleukines (IL) ou encore les interférons (IFN).
- ✦ **Immunoglobuline IgA** : Terme désignant une classe d'anticorps présents dans les muqueuses et permettant l'agglutination et la neutralisation des bactéries et des virus.
- ✦ **Immunoglobuline IgE** : Terme désignant une classe d'anticorps présents au niveau des basophiles et mastocytes pouvant déclencher des réactions rares mais sévères de type allergiques immunitaires et neutraliser des parasites.
- ✦ **Immunoglobuline IgG** : Terme désignant une classe d'anticorps présents dans le sang permettant la neutralisation des toxines, des bactéries et des virus.
- ✦ **Métaplasie** : Transformation d'un tissu adulte normal en un autre tissu adulte normal de structure et de fonction différentes. Il s'agit d'une adaptation réversible d'un tissu liée à une agression. Elle s'observe surtout au niveau des tissus épithéliaux, pouvant également intéresser les tissus conjonctifs.
- ✦ **Myéloperoxidase** : Terme désignant des enzymes produites par les globules blancs liées aux maladies inflammatoires et cardiovasculaires.
- ✦ **Neutrophile** : Terme désignant un type de leucocytes (globules blancs) ayant une affinité avec les colorants neutres.
- ✦ **Poche gutturale** : Terme désignant un diverticule (poche) situé entre le pharynx et l'oreille interne qui est exclusivement retrouvés chez les équidés.
- ✦ **Prévalence** : Nombre de personnes atteintes d'une certaine maladie à un moment donné dans une population donnée.

TABLES DES ILLUSTRATIONS

TABLES DES ILLUSTRATIONS

1-Tables des Figures

- Figure 1** : Photographie montrant une hypertrophie des muscles abdominaux obliques externes appelée 'Heave line', résultant d'un effort expiratoire d'un cheval atteint de MORVR (Léguillette, 2003)..... **15**
- Figure 2** : Cellules du liquide de lavage bronchoalvéolaire: a) Cheval sain: L=lymphocytes; M=macrophage; AM= macrophage actif; b) Cheval atteint de MORVR:N=neutrophiles; M=macrophage phagocytant un neutrophile (D'après Robinson, 1997) **17**
- Figure 3** : Pourcentage de neutrophiles chez un cheval sain comparé à un cheval atteint de MORVR (D'après Franchini *et al.*, 1998)..... **17**
- Figure 4** : Nombres relatif et absolu de neutrophiles (moyenne±SD) dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire de 6 chevaux sains et 7 chevaux atteints de MORVR en rémission après deux mois au pâturage (RAO rem= MORVR rem) ou en crise. Les astéris indiquent une différence significative (P<0,05) (D'après Art *et al.*, 2006) **18**
- Figure 5** : Concentration en myéloperoxydase (moyenne±SD) dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire collecté chez 6 chevaux sains et 7 chevaux atteints de MORVR en rémission après deux mois au pâturage (RAO rem= MORVR rem) ou en crise. (Les astéris indiquent une différence significative (P<0,05) (D'après Art *et al.*, 2006)..... **18**
- Figure 6** : Concentration des poussières totales et respirables dans l'écurie et dans la zone respiratoire du poney (BZ) sous un système conventionnel comprenant du foin et de la litière de moindre qualité (système C) et un système recommandé pour réduire les maladies pulmonaires équine comprenant des copeaux de bois et des granulés (système R). (D'après Woods *et al.*, 1993)..... **21**
- Figure 7** : Photographies de 3 filtres issus d'un prélèvement d'air dans la zone de respiration du cheval nourrit avec 3 foin différents : a) un cube d'*Alfalfa* (luzerne), b) du foin qualifié de bonne qualité et c) un foin qualifié de mauvaise qualité. (D'après Raymond *et al.*, 1994)..... **21**
- Figure 8** : Nombre de cellules du liquide de lavage broncho-alvéolaire chez des chevaux malades, 6h après l'inhalation d'une solution saline servant de témoin, de Hay Dust Suspension (HDS), HDS-Lipopolysaccharide (LPS) et HDS-LPS + LPS (D'après Pirie *et al.*, 2003) **23**
- Figure 9** : Schéma représentant le système respiratoire du cheval ainsi que le niveau de pénétration de chacune des fractions de poussière (D'après Art *et al.*, 2002)..... **29**
- Figure 10** : Classification simplifiée des Eumycota (D'après Courtecuisse et Duhem, 2007; Kirk *et al.*, 2008)..... **30**
- Figure 11** : Exemple de structures rencontrées chez les *Ascomycota* et les *Anamorphic Fungi* (D'après Bouchet *et al.*, 2005) **31**
- Figure 12** : Exemple de structures rencontrées chez les *Zygomycota* (D'après Samson *et al.*, 2002)..... **31**
- Figure 13** : Evaluation du risque de contamination par les organismes fongiques au cours de la récolte, du stockage du fourrage et de l'utilisation. (Boudra *et al.*, 2002) **33**

Figure 14 : Microflore caractéristique des foins récoltés dans de bonnes conditions de récolte (A) et des foins récoltés dans de mauvaises conditions de récolte (récolte à 75 % MS, pluie) (B) (Hnatyszczym & Guais, 1986).....	33
Figure 15 : « The Beggars » par Pieter Bruegel the Elder en 1568, (ca. 1525-1569). Cette peinture représente des victimes de l'ergotisme gangréneux engendré par <i>Claviceps purpurea</i> au Moyen-Âge, appelé également « Feu de Saint Antoine ». L'ergotisme est la plus ancienne mycotoxicoïse reconnue chez l'homme. Copyright Réunion des Musées Nationaux/ Art Resource, NY, Louvre, Paris, France.....	35
Figure 16 : Structure des mycotoxines détectées dans les fourrages conservés (Gareis & Wernery, 1994 ; Auerbach <i>et al.</i> , 1998 ; Buckley <i>et al.</i> , 2007; O'Brien <i>et al.</i> , 2007)et/ou ayant un effet sur la santé équine (Schurg & Noon, 1979 ; Gimeno <i>et al.</i> , 1983 ; Wilson <i>et al.</i> 1990 ; Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Meerdink, 2002 ; Raymond <i>et al.</i> , 2003) à savoir les aflatoxines, la gliotoxine, la zéaralénone, le déoxynivalénol, les fumonisines, la toxine PR et la roquefortine.....	36
Figure 17 : Structure de la paroi d'une bactérie Gram- (Greff-Mirguet, 2002)	40
Figure 18 : Structure du LPS chez <i>Salmonella tiphimurium</i> (INRS, 2005)	40
Figure 19 : photographies de deux espèces d'acariens, <i>Tyrophagus putrescentiae</i> et <i>Acarus siro</i> pouvant être retrouvées dans le foin (source: futura-science, 2006)	41
Figure 20 : Schéma récapitulatif de la production de foin sous des conditions météorologiques favorables	44
Figure 21 : Comparaison de la vitesse de séchage en fonction du type de faucheuse utilisée : faucheuse classique versus faucheuse conditionneuse. (D'après Arvalis, 2003)	45
Figure 22 : Courbe de dessiccation d'une plante entière (P.E.) de ray-grass italien au stade début épiaison du premier cycle accompagnée des courbes de dessiccation des tiges et des limbes pris individuellement ou associés. Les courbes de dessiccation Ts et Ta concernent respectivement les aptitudes de séchage des tiges séparées (Ts) ou non (Ta) des limbes. Les courbes de dessiccation Fs et Fa concernent respectivement les aptitudes de séchage des limbes séparées (Fs) ou non (Fa) des tiges (20°C-50°C HR - 1m/s) (D'après Jones, 1979).....	49
Figure 23 : Influence de l'espèce végétale et du stade de végétation sur la durée de séchage (flux d'air de 1m/s, 20°C-50° % d'humidité relative) nécessaire pour atteindre 67% de MS (D'après Jones &Prickett, 1981)	50
Figure 24 : Stades de développement des espèces prairiales et stades de récolte conseillé pour l'ensilage, l'enrubannage et le foin (Herbe-actifs.org, 2009)	51
Figure 25 : Concentration en <i>Absidia corymbifera</i> dans le foin provenant de Finlande (n=29, ♦) et de France (n=63, x) selon la méthode de production de foin. (Reboux <i>et al.</i> , 2006)...	54
Figure 26 : Concentration en <i>Eurotium amstelodami</i> dans le foin provenant de Finlande (n=29, ♦) et de France (n=63, x) selon la méthode de production de foin (Reboux <i>et al.</i> , 2006)	54
Figure 27 : Schéma récapitulatif issu de l'analyse bibliographique montrant les facteurs principaux pouvant influencer la qualité sanitaire et plus spécifiquement les éléments qui la définissent : les champignons et mycotoxines, les poussières, les pollens et acariens et les bactéries Gram négatif et endotoxines.....	56
Figure 28 : Situation géographique du domaine expérimental INRA du Pin-au-Haras, en Basse-Normandie.	60
Figure 29 : Pluviométrie et température moyennes des 20 dernières années (1987-2008) accompagnées de la pluviométrie et des températures relevées durant l'année 2007 et	

2008 correspondant, respectivement, à la première et seconde année de production expérimentale de foin	60
Figure 30 : Espèces prairiales récoltées pour produire du foin monospécifique	68
Figure 31 : Fauche sélective des différentes espèces. Exemple avec <i>Trifolium repens</i> et <i>Lolium perenne</i>	68
Figure 32 : Schéma du dispositif expérimental servant à quantifier les poussières.....	69
Figure 33 : Exemple de spectre issu de la quantification des poussières aériennes contenu dans du foin. Une mesure est réalisée toutes les 6 secondes et ceci durant 30 min pour des fourrages secs.....	70
Figure 34 : Coefficients de variation du nombre de réplicats en fonction du temps de brassage. Des lettres différentes au dessus des barres verticales indiquent une différence significative à $p < 0.05$ (n=5, test de la médiane de Mood).....	70
Figure 35 : Nombre de particules en fonction de la masse de foin (en g) à analyser	70
Figure 36 : Quantification des poussières totales contenues dans les foins utilisés lors de la mise au point du protocole. Des lettres différentes au dessus des barres verticales indiquent une différence significative à $p < 0.05$ (n=10, test de la médiane de Mood).....	71
Figure 37 : Culture en boîte de Pétri d' <i>Aspergillus caespitosus</i> après 7 jours de culture sur milieux MEA à 25 °C (a), CYA à 25 °C (b) et CYA à 37 °C (c)	72
Figure 38 : La couleur des colonies diffère d'une espèce à l'autre	73
Figure 39 : Après 7 jours de culture, <i>Penicillium piceum</i> (à gauche) présente un diamètre de colonie plus élevé qu' <i>Eurotium repens</i> (à droite)	73
Figure 40 : Après 7 jours de culture, des exsudats de couleur rose apparaissent sur l'espèce <i>Aspergillus caespitosus</i>	73
Figure 41 : <i>Monascus ruber</i> se caractérise par un pigment soluble de couleur rouge qui diffuse dans la gélose	73
Figure 42 : <i>Fusarium culmorum</i> présente un revers rose-orangé sur milieu MEA	73
Figure 43 : <i>Aspergillus fumigatus</i> (en haut) présente une texture poudreuse avec peu de relief alors qu' <i>Eurotium amstelodami</i> (en bas) présente une texture veloutée velue avec du relief sur milieu MEA	73
Figure 44 : Exemple de conidiophores d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (a) et de <i>Penicillium roqueforti</i> (b) par observation microscopique (x 1000).....	74
Figure 45 : Exemple de cléistothèces, structures sexuées de l'espèce <i>Monascus ruber</i> accompagnées de structures végétatives par observation microscopique (x 1000)	74
Figure 46 : Protocole de dosage des mycotoxines dans la matrice foin	76
Figure 47 : Protocole de dosage des mycotoxines dans les poussières aériennes des foins à partir de filtres PTFE.....	76
Figure 48 : Protocole d'extraction liquide afin de quantifier les pollens, les endotoxines ainsi que la matière minérale contenus dans les poussières aériennes des foins	78
Figure 49 : Exemple de grains de pollens de trois espèces prairiales.....	79
Figure 50 : Protocole de dosage de la cellulose brute selon la méthode de Weende (Norme AFNOR, EN ISO 6865).....	81
Figure 51 : Protocole de dosage des protéines brutes selon la méthode Kjeldahl (Norme AFNOR, NF V 04-407)	81
Figure 52 : Répartition des genres fongiques (A) et plus particulièrement du genre <i>Aspergillus</i> (B) identifiés dans les foins témoins récoltés secs comparés aux foins récoltés dans de mauvaises conditions (pluie , récolte à 75 % MS) produits durant les deux années	

- d'expérimentations aux champ (*Chapitre I et II des résultats*). La moyenne des UFCs totales obtenues pour chaque traitement sont indiquées entre parenthèses **146**
- Figure 53** : Analyses en Composantes Principales des données récoltées à partir des deux années d'expérimentation au champ décrites respectivement au sein des chapitres 1 et 2 des résultats. A : Carte factorielle des critères d'évaluation de la qualité sanitaire des fourrages et B : des différents traitements dans le plan 1-2 qui représente 65,19 % de l'inertie. Deux critères de qualité dont les vecteurs se superposent sont corrélés, deux critères dont les vecteurs sont perpendiculaires sont indépendants l'un de l'autre **148**
- Figure 54** : Représentation dans le plan défini par les deux premiers axes (96% de l'inertie), de l'Analyse en Composantes Principales sur Variables Instrumentales (ACPVI1). A: Variables explicatives (densité, humidité au pressage et à l'analyse) ; B: Critères d'évaluation de la qualité sanitaire des fourrages. Les données utilisées sont issues des expérimentations décrites respectivement au sein des chapitres 1 et 2 des résultats **150**
- Figure 55** : Représentation dans le plan défini par les deux premiers axes, de l'Analyses en Composantes Principales sur Variables Instrumentales (ACPVI2). A Variables explicatives (Vitesse du vent, Température, pluviométrie); B: Critères d'évaluation de la qualité sanitaire des fourrages. Les données utilisées sont issues des expérimentations décrites respectivement au sein des chapitres 1 et 2 des résultats..... **151**
- Figure 56** : Observations à la loupe binoculaire des poussières issues de foin monospécifiques de 5 espèces prairiales, *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, *Alopecurus geniculatus*, *Poa trivialis*, *Holcus lanatus*..... **164**
- Figure I-1** : Monthly rainfall data during 2007, compared to the last 10 year averages, obtained from the meteorological data of INRA experimental unit of le Pin-au-Haras. **91**
- Figure I-2** : Quantity of viable spores at 25°C estimated from colony forming units per cubic meter (CFUs m⁻³) after growth at 25°C for 10 000 particles in the different experimentally produced hay. Data are in logarithmic scale. Mean values (n=4) with different letters are significantly different (P < 0.05)..... **96**
- Figure I-3** : Shannon and Weaver H' values estimated for the mycoflora in airborne dust at 25°C in the different experimentally produced hays. Mean values (n=4) with different letters are significantly different (P < 0.05) **97**
- Figure I-4** : Distribution of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and other genera obtained at 25°C in airborne dust contained in the different experimentally produced hays **97**
- Figure I-5** : Distribution of *Aspergillus* and *Eurotium* species obtained in airborne dust at 25°C contained in the different experimentally produced hays **97**
- Figure II-1** : Monthly rainfall data during 2008, compared to the average of the last 20 years, obtained from the meteorological data of the INRA experimental unit of Le Pin au Haras.. **110**
- Figure II-2** : Quantity of viable spores estimated from colony forming units per cubic metre (CFUs) after growth at 25°C (a) and quantity of viable spores expressed as 10⁵ particles (b) in the different experimentally produced hay. Data are in the logarithmic scale. Mean values (n=24) with different letters are significantly different (P < 0.05, Kruskal-Wallis test). Treatments were compared between each harvest (bold letters for the early harvest and italics for the late harvest). Then the 3 controls, early harvest, late harvest and second crop were compared (capital letters)..... **117**
- Figure II-3** : Shannon & Weaver H' values estimated for the mycoflora in airborne dust at 25°C in the different experimentally produced hays. Mean values (n=24) with different

letters are significantly different ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis and ANOVA). Treatments were compared among each harvest (bold letters for the early harvest and italics for the late harvest). Then the 3 controls, early harvest, late harvest and second crop were compared (capital letters)..... **118**

Figure III-1 : Monthly rainfall data during 2008, compared to the average of the last 20 years, obtained from the meteorological data of the INRA experimental unit of Le Pin au Haras **130**

Figure III-2 : Breathable dust content (diameter $<5\mu\text{m}$) in a) single-species hays and b) control hay and commercial forages. Mean values with different letters are significantly different ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis test; $n=12$) **136**

Figure III-3 : Endotoxin concentrations contained in grass forages expressed in Grade **139**

Figure III-4 : Graphic representation of nutritive and health qualities for 5 single-species hays. Values for each parameter are expressed as a percentage of the maximum value (100%) for that parameter observed among all species. Values at 100 % for each parameter are following: Breathable dust \rightarrow *Holcus lanatus*; CFU/ m^3 \rightarrow *Alopecurus geniculatus*; CFU/ 10^6 particles \rightarrow *Alopecurus geniculatus*; 1/CP \rightarrow *Alopecurus geniculatus* and CF \rightarrow *Alopecurus geniculatus* **139**

Figure III-5 : Graphic representation of nutritive and health qualities for commercial forages and control hay. Values for each parameter are expressed as a percentage of the maximum value (100%) for that parameter observed among all forage types. Values at 100 % for each parameter are following: Breathable dust \rightarrow Control; CFU/ m^3 \rightarrow Control; CFU/ 10^6 particles \rightarrow Haylage Lm; 1/CP \rightarrow Swiss hay; CF \rightarrow Swiss hay; Pollens \rightarrow Haylage Gr and Endotoxins \rightarrow Haylage Gr, Swiss hay and Control **141**

Crédits photos

Figures 41, 43a et b, 44a et b, 45 : **David Garon**

Figures 31, 37, 38, 39, 40, 42 : **Virginie Séguin**

Figures 49(pollens uniquement) : **Raphaël Ségura**

2-Tables des Tableaux

Tableau I : Résultats des analyses de la fréquence respiratoire, des gaz du sang, du liquide de lavage bronchoalvéolaire et d'hématologie chez des chevaux sains et atteints de MORVR (Valeur moyenne arithmétique \pm se, t-test) (D'après Kramaric <i>et al.</i> , 2004)	16
Tableau II : Espèces fongiques et actinomycètes isolés à partir de plusieurs sources de foins et litières (D 'après Clarke & Madelin, 1987)	22
Tableau III : Tableau récapitulatif de quantification de poussières dans différents fourrages et litières destinés aux chevaux	30
Tableau IV : Principaux constituants chimiques des fourrages (D'après Drogoul <i>et al.</i> , 2004)	46
Tableau V : Principaux constituants glucidiques des fourrages (D'après Drogoul <i>et al.</i> , 2004)	47
Tableau VI : Modifications de composition chimique, de digestibilité et d'ingestibilité entre fourrages verts et fourrages conservés (d'après Demarquilly <i>et al.</i> , 1998).....	52
Tableau VII : Concentrations moyennes d' <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Eurotium amstelodami</i> , et de <i>Wallemia sebi</i> (exprimées en 10^3 CFU. g ⁻¹) dans le foin présent dans les fermes à risque de FLD en fonction des pratiques culturales (n=71). Les mauvaises conditions de récolte correspondaient soit à un terrain inondable, une pluie durant la récolte ou une contamination par le sol du foin engendrée par la prolifération de campagnols. (D'après Roussel <i>et al.</i> , 2004)	53
Tableau VIII : Nombre moyen de colonies d'Actinomycètes thermophiles, de micromycètes et de bactéries Gram- par boîte de Pétri pour chaque ferme étudiée. (D'après Dalphin <i>et al.</i> , 1991).....	54
Tableau IX : Relevé floristique de la prairie utilisée pour la production expérimentale de foins. Coefficients d'abondance / dominance (A/D) de Braun-Blanquet (1964).....	61
Tableau X : Analyse du sol de la prairie du Pin-au-Haras, utilisée pour les expérimentations	61
Tableau XI : Tableau récapitulatif des parcelles 2007 accompagnées de leurs traitements respectifs.....	64
Tableau XII : Tableau récapitulatif des parcelles 2008 accompagnées de leurs traitements respectifs.....	66
Tableau XIII : Pourcentage de matière sèche dans les foins produits expérimentalement durant la seconde année de production à la fauche, au pressage et à l'analyse	68
Tableau XIV : Paramètres utilisés pour l'analyse des mycotoxines par CLHP-MS	77
Tableau XV : Paramètres utilisés pour la quantification des mycotoxines dans le foin par CLHP-SM.....	77
Tableau XVI : Pourcentage de matière minérale contenue dans différentes Poaceae et dans différents sols	80
Tableau XVI : Récapitulatif des codes attribués aux foins pour les analyses multivariées.....	148
Tableau XVII : Tableau récapitulatif des effets des pratiques culturales et des conditions météorologiques sur les critères d'évaluation de la qualité sanitaire des fourrages. Les données utilisées sont issues des expérimentations décrites respectivement au sein des chapitres 1 et 2 des résultats. Les foins témoins n'ont subi aucun des traitements mentionnés. L'analyse statistique est réalisée en considérant le seuil de signification à 5%.....	166

Table I-1 : Main parameters used for quantification of mycotoxins in hay by HPLC-MS.....	95
Table I-2 : Total airborne dust and breathable dust (diameter < 5 µm, n = 40) and mean concentrations (n=4) of viable spores estimated from colony forming units per cubic meter (CFUs m ⁻³) after growth at 25°C or 30°C, in the different experimentally produced hays. Mean values with different letters are significantly different (P < 0.05, Kruskal-Wallis test). Bold characters distinguish treatment significantly different from control.....	96
Table I-3 : Mean concentrations (n=4) of viable spores of <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> and the other genera estimated from colony forming units per cubic meter (CFUs m ⁻³) after growth at 25°C, in the different experimentally produced hays.....	97
Table I-4 : Mean concentrations (n=4) of viable spores of other allergenic or/and potentially toxicogenic species estimated from colony forming units per cubic meter (CFUs m ⁻³) after growth at 25°C, in the different experimentally produced hays.....	98
Table I-5 : Pollen, dry and mineral mass and soil contamination contained in total dust of different experimentally produced hays, obtained by liquid extraction. Mean values (n=4) with different letters are significantly different (P<0.05, Kruskal-Wallis test).....	98
Table I-6 : Effect of treatments on parameters used to evaluate health quality. Coefficient of variation (sd / mean) and significancy were determined for all treatments (**p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05)	99
Table II-1 : Mineral mass, crude fibre and crude protein content in experimentally produced hays.....	116
Table II-2 : Breathable dust content (diameter < 5 µm, n = 40) in the different experimentally produced hays	116
Table II-3 : Mean concentrations of different fungal genera, expressed in CFUs m ⁻³ , obtained at 25 °C in airborne dust contained in experimentally produced hays (n=24)	117
Table II-4 : Mean concentrations of <i>Aspergillus</i> and <i>Eurotium</i> genera in airborne dust, expressed in CFUs m ⁻³ , cultivated at 25°C from experimentally produced hays (n=24)	118
Table II-5 : Mean concentrations of the <i>Penicillium</i> genus in airborne dust, expressed in CFUs m ⁻³ , cultivated at 25°C from experimentally produced hays (n=24)	119
Table II-6 : Pollens and soil contamination contained in total dust of the different experimentally produced hays, obtained by liquid extraction.....	119
Table III-1 : Crude fiber and crude protein quantifications in a) single-species hays and b) control hay and commercial forages. Mean values with different letters are significantly different (P < 0.05, Kruskal-Wallis test; n=4)	135
Table III-2 : Mean concentrations of viable spores estimated from colony forming units per cubic meter (10 ³ CFU/m ³) after growth at 25°C and for 10 ⁶ particles, in a) single-species hays and b) control hay and commercial forages. Mean values with different letters are significantly different (P < 0.05, Kruskal-Wallis test; n=6 for single-species hays; n=8 for commercial forages and control hays)	136
Table III-3 : Mean concentrations of different fungal genera obtained at 25 °C in airborne dust contained in single-species hays (n=18) and control hay and commercial forages (n=24)	137
Table III-4 : Mean concentrations of <i>Aspergillus</i> and <i>Eurotium</i> genera obtained at 25 °C in airborne dust contained in single-species hays (n=18) and control hay and commercial forages (n=24)	137

Table III-5 : Mean concentrations of *Penicillium* genus obtained at 25 °C in airborne dust contained in single-species hays (n=18) and control hay and commercial forages (n=24) **137**

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Milieux de culture utilisés

Annexe 2 : Liste des espèces fongiques identifiées dans les poussières des foins analysés

ANNEXE 1**CYA** (*Czapeck yeast extract agar*)

NaNO ₃ ^a	3 g
K ₂ HPO ₄ ^a	1 g
KCl ^a	0,5 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O ^a	0,5 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O ^a	0,01 g
Extrait de levure ^c	5 g
Sucrose ^d	30 g
Agar ^b	20 g
(eau qsp 1l)	

CY20 (*Czapeck yeast 20 % sucrose*)

NaNO ₃ ^a	3 g
K ₂ HPO ₄ ^a	1 g
KCl ^a	0,5 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O ^a	0,5 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O ^a	0,01 g
Extrait de levure ^c	5 g
Sucrose ^d	200 g
Agar ^b	20 g
(eau qsp 1l)	

G25N (*25% glycerol nitrate agar*)

K ₂ HPO ₄ ^a	0,75 g
NaNO ₃ ^a	2,25 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O ^a	0,375 g
KCl ^a	0,375 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O ^a	0,0075 g
Extrait de levure ^c	3,7 g
Glycérol ^a	250 g
Agar ^b	12 g
(eau qsp 1l)	

MEA (*Malt extract agar*) pour identifications

Cristomalt ^e	15 g
Agar ^b	15 g
Chloramphénicol ^f	0,5 g
(eau qsp 1l)	

MEA (*Malt extract agar*) pour comptages

Agar à l'extrait de malt ^g	48 g
Chloramphénicol ^f	0,5 g
(eau qsp 1l)	

PDA (*Potatoes dextrose agar*)

Potatoes dextrose agar ^h	39 g
Chloramphénicol ^f	0,5 g
(eau qsp 1l)	

Tous les milieux sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes.

^a Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Etats-Unis

^b Acros Organics, Geel, Belgique

^c Fisher Scientific, Elancourt, France

^d Fluka, Buchs, Allemagne

^e Difal, Seysses, France

^f Cooper, Melun, France

^g Merck, Darmstadt, Allemagne

^h Difco, Le Pont de Claix, France

ANNEXE 2

Espèces fongiques et leurs autorités
<i>Absidia (Mycocladus) corymbifera</i> (Cohn) Saccardo & Trotter
<i>Absidia (Mycocladus) cylindrospora</i> Hagem
<i>Acremonium bacillisporum</i> (Onions & G.L. Barron) W. Gams
<i>Acremonium roseum</i> Petch
<i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler
<i>Aspergillus alliaceus</i> Thom & Church
<i>Aspergillus caespitosus</i> Raper & Thom
<i>Aspergillus candidus</i> Link
<i>Aspergillus carneus</i> (V. Tieghem) Blochwitz
<i>Aspergillus flavus</i> Link
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius
<i>Aspergillus niger</i> Tieghem
<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare
<i>Aspergillus sp.</i>
<i>Aspergillus sydowii</i> (Bain & Sart.) Thom & Church
<i>Aspergillus terreus</i> Thom
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuillemin) Tiraboschi
<i>Byssosclamyces nivea</i> Westling
<i>Chaetomium elatum</i> Kunze & J.C. Schmidt
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fries
<i>Chaetomium globosum variété flavo-viridae</i> Kunze ex Fries
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresenius) G.A. de Vries
<i>Cladosporium herbarum</i> (Persoon) Link
<i>Doratomyces microsporus</i> (Saccardo) F.J. Morton & G. Smith
<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuillemin
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin
<i>Eurotium herbariorum</i> (F.H. Wiggers) Link
<i>Eurotium repens</i> de Bary
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Saccardo
<i>Fusarium proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg
<i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg
<i>Gliocladium roseum</i> Bainier
<i>Mucor circinelloides</i> Tieghem
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer
<i>Mucor sp.</i>
<i>Paecilomyces viridae</i> Segretain, Fromentin, Destombes, Brygoo & Dodin ex Samson
<i>Penicillium atramentosum</i> Thom
<i>Penicillium aurentiogriseum</i> Dierckx
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx
<i>Penicillium capsulatum</i> Raper & Fennell
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom
<i>Penicillium citrinum</i> Thom
<i>Penicillium coraligerum</i> Nicot & Pionnat
<i>Penicillium expansum</i> Link
<i>Penicillium fellutanum</i> Biourge
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling
<i>Penicillium implicatum</i> Biourge
<i>Penicillium islandicum</i> Sopp
<i>Penicillium lividum</i> Westling

Espèces fongiques et leurs autorités
<i>Penicillium lolense</i> Pitt
<i>Penicillium megasporum</i> Orput & Fennell
<i>Penicillium piceum</i> Raper & Fennell
<i>Penicillium primulinum</i> Pitt
<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll
<i>Penicillium restrictum</i> Gilman & Abbott
<i>Penicillium roqueforti</i> Thom
<i>Penicillium sp.</i>
<i>Penicillium spinulosum</i> Thom
<i>Penicillium sublateritium</i> Biourge
<i>Penicillium variable</i> Sopp
<i>Penicillium velutinum</i> van Beyma
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx
<i>Penicillium verruculosum</i> Peyronel
<i>Penicillium viridicatum</i> Westling
<i>Phialophora fastigiata</i> (Laberg. & Melin) Conant
<i>Phoma</i> Saccardo
<i>Rhizoglyphus pusillus</i> (Lindt) Schipper
<i>Rhizopus</i> Ehrenb.
<i>Scopulariopsis brevicolis</i> (Saccardo) Bainier
<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenberg) S. Hughes
<i>Talaromyces flavus</i> (Klöcker) Stolk & Samson
<i>Trichoderma viridae</i> Persoon
<i>Trichotecium roseum</i> (Persoon) Link
<i>Verticillium nubilum</i> Pethybridge