

Présence des moisissures toxigènes et des mycotoxines dans les fourrages conservés. Signification et prévention

H. BOUDRA (1), D. P. MORGAVI (1), P. GALTIER (2), B. MICHALET-DOREAU (1)

(1) INRA, Unité de Recherches sur les Herbivores. Equipe de Digestion Microbienne. 63122 Saint-Genès-Champanelle.

(2) INRA, Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie, 31931 Toulouse Cedex 9

RESUME – Des altérations de fourrages par les moisissures ont été observées dans tous les systèmes de conservation. Elles conduisent à une diminution de la valeur alimentaire des fourrages et à une production de mycotoxines pouvant être néfaste à la santé des animaux et de l'homme. En raison de leur faible valeur marchande, les fourrages ont été très peu étudiés sur le plan de la contamination mycotoxique.

Cette synthèse résume les travaux sur la présence des moisissures toxigènes dans les fourrages verts et conservés et sur les conditions écologiques de leur développement, les conséquences d'une telle contamination sur la valeur alimentaires des fourrages et sur la santé des animaux et de l'homme. Nous terminerons cet article en évoquant des recommandations pratiques concernant la prévention et la maîtrise de ces contaminations, et les perspectives de recherche dans ce domaine.

Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in conserved forage: Significance and prevention

H. BOUDRA (1), D. P. MORGAVI (1), P. GALTIER (2), B. MICHALET-DOREAU (1)

(1) INRA, Unité de Recherches sur les Herbivores. Equipe de Digestion Microbienne. 63122 Saint-Genès-Champanelle.

SUMMARY – Fungi frequently spoil on farm-conserved forages. Fungal contamination decreases the nutritional quality of forages. Fungi also produce mycotoxins, which negatively affect animal and human health. Due to their low market value, the contamination of forages by mycotoxins has not been extensively studied. This review summarizes the existing information on the presence of toxigenic fungi in growing and conserved forages and the ecological conditions favoring their development. The consequences of fungal contamination on forage quality, and animal and human health are described, along with practical recommendations for the prevention and control of fungal contamination. Future research directions in this area are discussed.

INTRODUCTION

Compte tenu des conditions économiques et réglementaires ainsi que de la demande sociale, les éleveurs augmentent la part des fourrages dans les rations alimentaires des ruminants. En raison de la répartition irrégulière et saisonnière de la production des fourrages, le recours à la conservation de ces aliments est une étape incontournable. L'objectif est de pouvoir proposer des fourrages durant des périodes de déficit fourrager. Il existe deux modes dominants de conservation des fourrages : le foin qui demeure une image de marque dans certaines régions de France pour la fabrication des fromages et l'ensilage d'herbe ou de maïs dont l'utilisation n'a cessé d'augmenter durant ces 15 dernières années, en particulier dans les régions de production intensive de lait. La conservation des fourrages est basée essentiellement sur le séchage rapide à une teneur en eau inférieure à 15-20% pour le foin, et sur la combinaison d'une anaérobiose avec une "homo fermentation" par des bactéries lactiques pour les ensilages, permettant une acidification rapide à un pH entre 4 et 5. La majorité des moisissures ne peuvent se développer sur ces types d'aliments en raison notamment de leur caractère aérobic. Toutefois, des altérations par les microorganismes sont régulièrement observées, celles provoquées par les moisissures sont localisées en surface et présentent souvent une croissance importante et sont macroscopiquement visibles. A l'inverse des céréales, la contamination des fourrages et des ensilages par les moisissures et les mycotoxines a été très peu étudiée et peu contrôlée. Ceci peut s'expliquer en partie par l'absence de valeur marchande des fourrages conservés qui sont produits et consommés *in situ*. Le développement des moisissures s'accompagne d'une modification plus ou moins importante de l'aliment, avec une production de mycotoxines sous certaines conditions. Les altérations induites par les moisissures sont d'une grande importance économique en raison des pertes qu'elles occasionnent et du caractère onéreux des mesures de séchage et de conservation (additifs et conservateurs) qu'elles nécessitent, mais aussi des problèmes de sécurité alimentaire pour l'homme par l'intermédiaire des produits (lait et viande) qui peuvent être contaminés.

1. MECANISMES DE CONTAMINATION PAR LES MOISSURES ET LES MYCOTOXINES

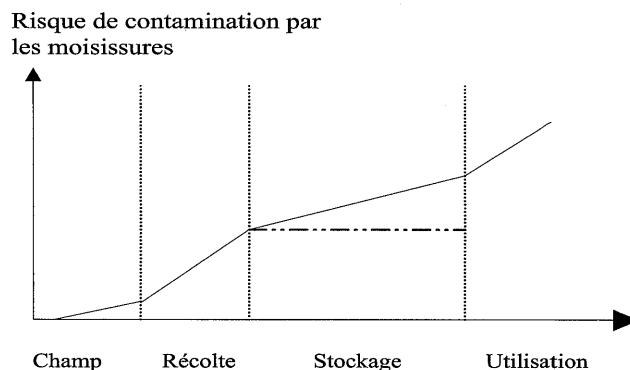
1.1. LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA CONTAMINATION DU FOURRAGE

La contamination des fourrages par les moisissures est inéluctable. Un grand nombre et une grande diversité de microorganismes de diverses origines sont présents dans les fourrages verts fraîchement récoltés. La contamination débute au champ et se poursuit au cours des processus de récolte, de séchage, de manutention et de stockage (Figure 1). Au cours de la récolte, la grande partie de l'inoculum est apportée par la terre, les poussières et les débris de végétaux moisies de la récolte précédente restés au champ ou dans le silo. La confection du fourrage va soit stabiliser la contamination, soit l'aggraver si elle n'est pas réalisée selon les Bonnes Pratiques Agricoles. Au cours de la conservation, la plupart des moisissures persistent sous forme de spores, mais une partie seulement de ces contaminants est capable de se développer dans les conditions de stockage.

Toutefois c'est au moment du désilage que le risque d'altération par les moisissures est le plus important.

Plus d'un millier de métabolites secondaires d'origine fongique peuvent être produits dans les conditions de laboratoire (Cole et Cox, 1981). Ce nombre pourrait être inférieur à la réalité, car les études réalisées jusqu'ici ne décrivent qu'un faible pourcentage d'espèces fongiques effectivement présentes. Mais une partie seulement des métabolites identifiés (environ une trentaine) possèdent expérimentalement une activité biologique, et sont retrouvés à des niveaux appréciables comme contaminants naturels des aliments.

Figure 1
Les étapes « à risque » durant la récolte et la conservation des fourrages



1.2. FACTEURS INFLUENÇANT LA CROISSANCE DES MOISSURES ET LA TOXINOGENÈSE

Les fourrages conservés et stabilisés hébergent à l'état latent de nombreuses espèces fongiques. Ceci est sans conséquence préjudiciable pour l'animal consommateur tant que les conditions écologiques et nutritionnelles ne permettent pas un développement fongique. La compréhension des mécanismes régissant la croissance des moisissures avec éventuellement la production de mycotoxines dans les fourrages conservés revêt une importance primordiale, elle permet de mettre en place une prévention raisonnée. Ces mécanismes sont principalement régis par des facteurs environnementaux. En plus du couple température-teneur en eau, le confinement ou l'anaérobiose et la présence d'autres microorganismes (bactéries et levures) dans les ensilages sont susceptibles d'exercer une compétition importante pour l'occupation du substrat.

1.2.1. Couple température-teneur en eau

La teneur en eau et la température sont les deux facteurs déterminants de la croissance fongique. Le rôle de la teneur en eau du végétal dans l'altération fongique des fourrages conservés varie selon la nature du fourrage. Pour le foin, le taux d'humidité des fourrages au moment de la confection des balles rondes est déterminant pour la colonisation ultérieure par les moisissures. En revanche, la teneur en eau dans les ensilages est élevée et incompatible avec une croissance fongique. En pratique, pour les produits présentant une activité en eau (A_w) supérieure à 0,90, les bactéries sont sensiblement plus compétitives. Pour des A_w comprises entre 0,90 et 0,85, les levures et les moisissures sont déterminantes dans l'altération des fourrages alors que seules certaines bactéries comme les bactéries lactiques sont capables de se développer. Enfin dans le cas de faibles A_w (inférieures à 0,85), seules certaines espèces fongiques xérophiles peuvent se développer, comme l'*Aspergillus (A.) glaucus* et *A. terreus*. La plupart des moisissures ont des optimum de croissance entre 25 et 35°C. Certaines espèces thermophiles peuvent même se développer à des températures supérieures, c'est le cas de l'*A. fumigatus*, espèce fréquente des fourrages conservés. La température optimale de toxino-génèse est généralement voisine de celle de la croissance, toutefois des études ont montré l'effet activateur et positif des températures cycliques sur la production de mycotoxine. En effet, Richard-Molard (1989) a montré que la production d'aflatoxine B1 (AFB1) par l'*A. parasiticus* aux températures cycliques de 25/40°C est nettement plus importante qu'à une température moyenne constante. Des situations similaires (températures cycliques) sont observées durant le stockage des ensilages et des balles rondes enrubbannées (BRE) à température ambiante.

1.2.2. L'anaérobiose

La conservation en atmosphère modifiée (AM), c'est à dire pauvre en O_2 et riche en CO_2 , a été très utilisée en alimentation humaine pour limiter l'altération fongique. Des études expérimentales conduites en AM ont conduit à la réduction ou

l'inhibition totale de la mycotoxinogénèse. Dans des conditions de confinement de 60% en CO₂, la production d'aflatoxine est significativement réduite (Wilson et Jay, 1975 ; Wilson *et al*, 1985). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'acide pénicillique (Lillehoj *et al*, 1972) ou, la T2-toxine (Paster et Menasherov, 1988). En revanche, le développement des moisissures est toujours présent dans ces conditions, il est certes retardé mais jamais complètement arrêté (Wilson *et al*, 1975 ; Paster et Menasherov, 1988). L'efficacité de l'AM est optimisée par la maîtrise du couple température-humidité essentiel pour le développement fongique. Hale *et al* (1978) puis Magan et Lacey (1984) ont montré que la combinaison de ces facteurs aboutit à une amélioration de la conservation par effet synergique. Dans les fourrages conservés, certaines espèces microaérophiles ou tolérantes au confinement peuvent se développer. C'est le cas particulièrement de certaines espèces toxigènes comme *Byssoschlamys nivea*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus fumigatus* ou *Monascus purpureus*.

1.2.3. Le pH

Le pH acide entre 4 et 5 obtenu après fermentation lactique des ensilages peut prévenir la contamination par certaines espèces fongiques. Gregory *et al* (1963) et Lacey (1975) ont montré que l'acidité de l'ensilage n'est pas favorable à la croissance de l'*A. flavus* et par conséquent à la production d'AFB1. La patuline présente naturellement dans l'herbe, disparaît totalement après ensilage (Hacking et Rosser, 1981). De même, nous avons constaté que la production *in vitro* de la gliotoxine est significativement moins importante à pH 4 qu'à pH 6 (Boudra *et al*, 2002a).

1.2.4. Compétition avec d'autres microorganismes

La microflore des fourrages conservés est riche et variée notamment dans les ensilages où des bactéries, des levures et des moisissures peuvent coexister. Les bactéries sont dominantes dans les fourrages humides (ensilage et BRE) en début de conservation alors que les moisissures sont majoritaires en fin de conservation. La sélection des espèces fongiques évolue en permanence au cours de la conservation en fonction du couple température-humidité du végétal et des espèces en présence. C'est ainsi que la présence de *Trichoderma viridae* exclut toutes les autres espèces dans le milieu (Le Bars et Le Bars, 1989). Il est bien connu que les mycotoxines produites sont progressivement dégradées par l'espèce productrice ou par les autres microorganismes présents. La production de patuline est affectée par le taux de levures présent dans l'ensilage (Dutton *et al*, 1984) alors que l'AFB1 peut être dégradée par *A. flavus* ou *A. parasiticus* (Doyle et Marth, 1978). En culture pure, *B. nivea* produit 42,5 ppm de patuline sur un ensilage tandis qu'en compétition avec d'autres microorganismes, les taux de production sont largement inférieurs (Escoula, 1977). La production *in vitro* de gliotoxine atteint un maximum après 6 jours d'incubation et décroît de plus de 50% après 14 j d'incubation (Boudra *et al*, 2002b). Etant donné sa stabilité, il est raisonnable de penser que la gliotoxine soit réutilisée ou dégradée par l'*A. fumigatus*.

1.2.5. L'addition de conservateurs

De nombreuses études ont été réalisées pour tester l'efficacité des conservateurs sur la qualité de conservation des ensilages d'herbe, évaluée à travers le profil fermentaire des ensilages (Andrieu *et al*, 1990), et sur la reprise des fermentation aérobies dans les ensilages de maïs, évaluée à travers l'évolution des températures (Higginbotham *et al*, 1998), mais dans ces travaux les aspects moisissures et toxino-génèse étaient rarement pris en compte. Les rares travaux sur le sujet ont montré que certains conservateurs (p-méthyl- et p-propyl Hydroxybenzoate, acide benzoïque et acide sorbique) sont capables de stimuler *in vitro* la production d'aflatoxine (Bauer *et al*, 1983 ; Gareis *et al*, 1984 ; Sanchis *et al*, 1988) et de la T2-toxine (Bauer *et al*, 1983 ; Gareis *et al*, 1984). En revanche, l'acide propionique n'a pas d'effet sur la production de l'AFB1 et de la T2-toxine (Bauer *et al*, 1983). L'effet stimulateur de la pro-

duction de ces toxines par l'acide sorbique aux doses proches de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pourrait s'expliquer par l'inhibition du cycle des acides tricarboxyliques entraînant ainsi une accumulation de l'acétyle coenzyme A, intermédiaire essentiel de la biosynthèse de l'aflatoxine et de la T2-toxine (Gareis *et al*, 1984). Le développement fongique dans les BRE d'herbe n'est pas significativement réduit par l'addition d'acide propionique seul ou en association avec de l'acide formique (Randby, 1996). Marin *et al* (1999) ont étudié l'efficacité des propionates sur l'altération par les moisissures, en fonction de l'activité en eau (Aw), la température et le temps de conservation. Tous ces facteurs interviennent significativement sur la croissance des *Fusarium* mais avec un effet plus important de l'Aw ou de la température. Selon la dose d'acide sorbique utilisée, le développement de l'*A. flavus* peut être retardé (0,05 %) ou totalement inhibé (0,1 %) (Gareis *et al*, 1984). Dans notre laboratoire, les essais d'homologation des conservateurs d'ensilage ont montré, dans la plupart des cas, un développement fongique en surface plus ou moins important alors que les critères de conservation étaient bons (résultats non publiés), ces observations viennent confirmer les travaux de Randby (1996).

2. PRINCIPALES MOISSURES ET MYCOTOXINES DES FOURRAGES

2.1. MOISSURES ET MYCOTOXINES DU CHAMP

Certaines espèces fongiques habituellement classées comme saprophytes peuvent se développer et produire des mycotoxines au champ. Ainsi, *Aspergillus flavus* peut contaminer au champ différentes denrées, comme les fruits (Buchanan *et al*, 1975 ; Dickens et Welty, 1975 ; Boudra *et al*, 1994), ou les céréales (Marsh *et al*, 1969 ; Shotwell *et al*, 1972 ; Fennell *et al*, 1973) mais c'est incontestablement le genre *Fusarium* qui sévit le plus en fin de maturation du végétal (Mills, 1989 ; Almeida *et al*, 2002). Ces moisissures se développent après un stress provoqué par la sécheresse ou une attaque par les insectes, lesquels introduisent les spores en contact direct avec les nutriments. Il existe deux mycotoxico-ses actuellement reconnues en relation avec la consommation d'herbe de pâturage. Ces toxicoses sévissent essentiellement en Nouvelle Zélande (Towers, 1993), quelques cas ont été rapportés en France (Le Bars et Le Bars, 1996).

L'*eczéma facial des ruminants* est provoquée par l'ingestion de sporidiesmine produite par *Pythomyces chartarum*. Cette pathologie se manifeste par une lésion cutanée de photosensibilisation faisant suite à une atteinte hépatique. Cette moisissure saprophyte se développe sur l'herbe sèche dans des conditions particulières de forte humidité et de chaleur.

Le syndrome appelé "*Ryegrass staggers*" se manifeste à la suite de l'ingestion de graminées du genre *Lolium* et *Festuca* contaminées par des toxines tremorgènes, notamment le lolitrem B. La maladie se caractérise en début d'intoxication par des tremblements suite à une atteinte nerveuse. Ces toxines souvent associées à d'autres molécules comme l'ergovaline, sont produites par des champignons endophytes du genre *Neotyphodium*, anciennement appelé *Acremonium spp.* Le lolitrem B et l'ergovaline ont été retrouvés dans les fourrages à des taux élevés (Durix *et al*, 1998 ; Craig et Blythe, 2000). Mais la consommation par des vaches laitières de foin contenant de forte teneur en ergovaline (960 µg/kg MS) n'a pas entraîné d'effets ni sur l'ingestibilité, ni sur la production laitière (Bony *et al*, 1998).

Les *Fusarium spp.*, producteurs de zéaralénone sont des espèces fréquentes de la flore des pâturages en Nouvelle Zélande (Di Menna et Parle, 1970). La zéaralénone a été détectée sur des échantillons d'herbe verte à des taux entre 300 et 3000 µg/kg MS (Towers, 1993).

Outre le métabolisme fongique, il existe au champ d'autres mécanismes de production des toxines. La présence de moisissures dans un végétal vivant (luzerne, trèfle) peut entraîner une exacerbation des réactions métaboliques conduisant à des concentrations anormalement élevées d'un constituant habituel. C'est le cas des phytoestrogènes, notamment le coumes-

trol qui peut se retrouver à des concentrations importantes (30 à 350 mg/kg de MS) dans la luzerne ou le trèfle, après une attaque par des larves d'insectes (Phytonomes) au printemps ou par des agents fongiques en automne (*Pseudopezia*, *Oidium*, ...) (Le Bars et Le Bars, 1989).

2.2. MOISSISSURES ET MYCOTOXINES AU COURS DE LA CONSERVATION

Les principales moisissures retrouvées dans les fourrages conservés appartiennent à des espèces saprophytes et ubiquistes. Ces espèces sont très différentes de celles rencontrées dans le champ ; elles appartiennent essentiellement aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Monascus*, *Geotrichum*, *Trichoderma*, (Le Bars, 1976 ; Le Bars et Labouche, 1979 ; Pelhate, 1987 ; Nout *et al*, 1993). Les données concernant la présence à l'état naturel des mycotoxines dans les fourrages conservés sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1
Présence à l'état naturel de mycotoxines dans les fourrages conservés

Références	Fourrages	Echant. positifs	Mycotoxine(s) Retrouvée(s)	Taux (mg.kg ⁻¹)
	Ensilage			
Escoula, 1974	Maïs	16/26	Patuline	1,5- 40
	Seigle	0/3	Patuline	0
	Graminée	0/3	Patuline	0
Hacking, 1981	Ensilage	0/10	Patuline	0
Nout, 1993	Pulpe betterave	0/25	PR-toxine	0
Auerbach, 1998	Maïs	9/12	Roquefortine C	0,2-15
	Herbe	12/12	Roquefortine C	0,7-36
Schneweis, 2000	Maïs	38/135	ac. mycophénolique	200 – 230
	Herbe	36/98	ac. mycophénolique	210 – 350
Schneweis, 2001	Herbe	23/98	Monacoline KA	0,03-65,4
		22/98	Monacoline KL	0,03-15,6
		4/98	Citrinine	3,7-4,4
	Fourrage sec			
Mirocha, 1992	Herbe	4/40	Fumonisine B1	1-9
Gareis, 1994	Herbe	?	Gliotoxine	0,49
Craig et Blythe, 2000	Foin, paille	?	Lolitre	0,1-0,3
			Ergovaline	0,1-0,4
Schneweis, 2001	Foin	27/135	Monacoline KA	0,036-26,1
		23/135	Monacoline KL	0,03-10,9
		10/135	Citrinine	0,003-0,064

La microflore des ensilages peut schématiquement être divisée en deux groupes, les microorganismes désirables et les microorganismes indésirables. Les bactéries lactiques appartiennent au premier groupe et jouent un rôle clé dans la réussite des processus de conservation des ensilages. Les microorganismes appartenant au second groupe sont capables d'altérations en anaérobiose comme les *Clostridium* et les *Entérobactéries*, mais également en aérobie avec les *Listeria*, les levures et les moisissures. Une soixantaine d'espèces de moisissures ont été isolées des ensilages, mais un nombre limité peut effectivement se développer au sein de la masse. Dans la suite de cette revue, nous décrirons seulement les principales moisissures toxigènes rencontrées dans les fourrages secs et humides (Tableau 2).

Tableau 2
Quelques mycotoxicoses animales décrites en France (d'après Le Bars et Le bars, 1996)

Mycotoxicose	Mycotoxines	Espèce fongique	Plante hôte	Animaux hôtes
Ray gras staggers	Lolitre, paxilline	<i>Acremonium lolii</i>	ray gras	ovins
Syndrome oestrogénique	Coumestrol	<i>Pseudopezia</i>	trèfle, luzerne	porc, bovins, ovins
Sialhorrhée	Slaframine	<i>Rhizoctonia leguminicola</i>	trèfle, luzerne	ruminants
Eczéma facial des ruminants Leuco-Encéphalomalacie Syndrome oestrogénique Stachybotriotoxicoxe	Sporidesmines	<i>Pithomyces chartarum</i>	herbes	ovins, bovins
	Fumonisinés ?	<i>Fusarium moniliforme</i>	maïs	chevaux
	Zéaralénone	<i>Fusarium graminearum</i>	maïs, herbe	porc
	Satratoxines	<i>Stachybotris atra</i>	paille, foin	chevaux, bovins
	Patuline	<i>Byssoschlamys nivea</i>	maïs, betterave	ovins, bovins
		<i>Paecilomyces varioti</i>		
		<i>Penicillium sp.</i>		
	PR toxine, Roquefortine	<i>P. roqueforti</i>	maïs	ovins, bovins

A. fumigatus est l'une des espèces majeures retrouvées dans les fourrages (Smith et Lynch, 1972 ; Cole *et al*, 1977 ; Gareis et Wernery, 1994), elle se trouve souvent associée à l'échauffement des balles rondes de foin. Récemment, nous avons isolé des souches d'*A. fumigatus* à partir de paille et d'ensilage de maïs impliqués dans l'intoxication d'un troupeau de vaches laitières en Normandie. D'autres souches ont été isolées d'un poumon après autopsie et de lésions dermiques provoquées par une teigne à *Trichophyton verrucosum*. En culture pure, cette espèce est capable de produire plusieurs toxines : la gliotoxine et des toxines trémorgènes (fumitremorgène A, B, et C ; verruculogène ; et la TR-2) et alcaloïdique (fumiglavine A et B). Les tests de toxinogénèse sur milieu de synthèse classique montrent que peu de souches d'*A. fumigatus* produisent de la gliotoxine (Cole *et al*, 1977 ; Land *et al*, 1987) alors que l'augmentation de la composition du milieu de culture, en sucre et en protéines, améliorent nettement le pourcentage de souches toxigènes (Belkacemi *et al*, 1999 ; Boudra *et al*, 2002a). L'*A. fumigatus* est le principal agent responsable de cas d'aspergillose, et la gliotoxine a été détectée sur des échantillons de poumon de dinde et de mamelles infectés par *A. fumigatus* (Bauer *et al*, 1989 ; Gareis et Wernery, 1994). De plus, l'extrait de culture de l'*A. fumigatus*, administré par voie orale à la souris et au rat, montre une forte action trémorgène (Land *et al*, 1987).

Penicillium roqueforti est une moisissure présentant une tolérance à l'acidité du milieu et à l'anaérobiose. C'est une espèce majeure des ensilages de maïs (Nout *et al*, 1993 ; Schneiweis *et al*, 2000 ; Auerbach *et al*, 1998) et de pulpe de betterave (Nout *et al*, 1993). Dans les conditions de laboratoire, *P. roqueforti* peut produire plusieurs toxines (Cole et Cox, 1981). A l'état naturel, l'acide mycophénolique a été retrouvé dans 74% des ensilages examinés à des doses comprises entre 20 et 25000 µg.kg-1 (Schneiweis *et al*, 2000). La roquefortine a été retrouvée dans des ensilages de maïs et d'herbe à des taux moyens de 6 et 17 µg.kg-1, respectivement (Auerbach *et al*, 1998).

Byssoschlamys spp dont le principal représentant est le *B. nivea*, est une moisissure blanche prenant en masse parfois l'ensilage. La patuline est la principale toxine produite par cette espèce, elle est retrouvée dans les ensilages à des concentrations pouvant atteindre 40 ppm (Escoula, 1977).

Monascus purpureus est une espèce fréquente des ensilages, elle est à l'origine de leur coloration en rouge. L'analyse mycologique de 233 ensilages de maïs et d'herbe a montré que plus de 19 % des échantillons étaient contaminés par cette espèce (Schneiweis *et al*, 2000). Cette espèce longtemps considérée comme non toxigène, s'est avérée sous certaines conditions, productrice de métabolites secondaires comme la citrinine ou les monakolin Ka et Kl, qui seraient à l'origine d'une diminution de la digestion des constituants pariétaux dans le rumen (Schneiweis *et al*, 2001).

Une attention particulière doit être réservée aux fusariotoxines notamment la fumonisine B1 (FB1), régulièrement retrouvée dans le maïs (Sydenham *et al*, 1990 ; Ueno *et al*, 1993 ; Gamanaya et Sibanda, 2001 ; Weindenböner, 2001). Le *F. moniliforme*, espèce productrice de la FB1, est majoritaire parmi la flore retrouvée sur le maïs (Le Bars *et al*, 1994). *Stachybotrys atra* est une espèce cellulolytique capable de coloniser le foin comme la paille. La stachybotriotoxine affecte plusieurs animaux notamment les ruminants. L'*A. flavus*, producteur de l'AFB1 douée de propriétés cancérogènes, est rarement produite dans les fourrages, mais se retrouve sur les fourrages secs des pays chauds et humides comme l'Afrique (Le Bars et Labouche, 1979). D'autres moisissures sont suspectées de produire des toxines non encore identifiées car des extraits d'aliment administrés par voie orale à des animaux provoquent des symptômes d'intoxication, alors que la recherche de mycotoxines connues s'avère négative.

3. CONSÉQUENCES DU DÉVELOPPEMENT FON- GIQUE

Le développement des moisissures peut s'accompagner d'une modification sensible de la valeur alimentaire du végétal et d'une production de mycotoxines susceptibles d'être dange-
reuses pour l'animal et l'homme.

3.1. ALTÉRATION DE LA VALEUR ALIMENTAIRE ET DES QUALITÉS ORGANOLEPTIQUES

Les micromycètes possèdent un arsenal enzymatique varié leur permettant d'utiliser plusieurs types de substrats. Sous certaines conditions, notamment de température et d'humidité, ils peuvent se développer et provoquer de multiples modifica-
tions biochimiques et nutritionnelles. Les processus de dégra-
dation initiés par les enzymes du végétal, sont relayés par les microorganismes (bactéries, levures et moisissures) notam-
ment dans l'ensilage entraînant des modifications de la com-
position chimique du fourrage. Les pertes touchent essen-
tiellement la quantité de matière sèche (MS), et les teneurs en
glucides et en matières azotées. L'accumulation de certains
produits de dégradation (acides gras volatils, acide lactique,
ammoniac) est souvent utilisée comme un indicateur de la qua-
lité de l'ensilage (Dulphy *et al*, 1981). Si le rôle de bactéries
comme les bactéries lactiques, les entérobactéries, *Clostridium*
ou *Bacillus*, a été largement étudié, l'intervention des mois-
sures dans ces processus d'altération des fourrages est mal
connu et n'a pas été quantifié. De plus, un développement fon-

gique même minime sur les fourrages confère à ces derniers un
goût de moisi constituant un facteur de refus et/ou une dimi-
nution des quantités ingérées.

3.2. EFFETS SUR LA SANTÉ ANIMALE ET HUMAINE (RISQUES TOXICOLOGIQUES)

Les effets de l'altération des fourrages par les moisissures sur
l'animal et l'homme sont rarement identifiés. Certaines
espèces fongiques sont directement responsables de mycoses
et de réactions allergiques chez l'homme et l'animal. Les
effets les mieux connus sont ceux provoqués par *A. fumigatus*,
espèce responsable d'aspergillose pulmonaire (Richard *et al*,
1996a) et de mammites (Bauer *et al*, 1989) chez les animaux.
Le premier cas de mycotoxicose remonte à 1960 en Angleterre
dans les élevages industriels de dindons, lorsque une ingestion
d'une forte dose d'aflatoxines a provoqué une mortalité de
plus de 10 000 dindonneaux. Depuis, de nombreuses autres
mycotoxicoses ont été décrites dont certaines en France (Le
Bars, 1996). Actuellement, le problème des mycotoxines en
santé animale peut être comparé à un iceberg. La faible partie
visible représente les mycotoxicoses aiguës observées lors
d'ingestion de grandes quantités de mycotoxines, elles sont
actuellement très rares. La face cachée de l'iceberg, plus
importante et plus difficile à reconnaître, représente les effets
d'une ingestion continue de toxines à faibles doses, seules ou
en associations avec d'autres toxines ou autres pathogènes.
Cette dernière situation peut se traduire par une diminution des
performances animales ou une prédisposition accrue à des
maladies en raison des propriétés immunosuppressives
caractérisant un grand nombre de mycotoxines des fourrages
conservés. C'est ainsi que l'ingestion de faibles doses d'afla-
toxines pourrait être reliée à un accroissement de la sensibilité
à la salmonellose, à la candidose ou à la coccidiose chez la
volaille (Hamilton et Harris, 1971 ; Pier *et al*, 1980); à la sal-
monellose ou à la dysenterie chez le porc (Pier *et al*, 1980). Le
diagnostic des mycotoxicoses demeure difficile en raison de
signes généraux non spécifiques. A l'exception de signes à
forte présomption diagnostique comme le syndrome oestrogé-
nique chez le porc ou l'eczéma facial des ruminants qui évo-
quent fortement une intoxication par la zéaralénone et la spo-
ridesmine respectivement, les effets dus aux mycotoxines
peuvent facilement passer inaperçus en présence d'autres
maladies d'accompagnement comme les carences nutrition-
nelles, les maladies infectieuses ou métaboliques. Le test de
toxicité des extraits organiques à partir d'une culture fongique
effectué dans le cas d'une suspicion de mycotoxicose a ses
limites. Par exemple, des extraits de culture d'*A. flavus* se sont

Tableau 3
Présence de mycotoxines dans le lait et ses dérivés en Europe (résultats d'enquête)

Mycotoxines	Pays	Produits laitiers	Ech. positif	Taux (ng.kg ⁻¹)	Références
Aflatoxine M1	Allemagne	Lait et dérivés	265/279	0,3-68	Heeshen <i>et al</i> , 1981
	France	Fromage	0/100		Corbion et Frémy, 1978
	France	Poudre Lactosérum	35/86	500-2000	Frémy et Gaymard, 1980
	France	Lait et dérivés	430/1046	80-5200	Blanc et Karleskind, 1981
	France	Lait en Poudre	32/102	500-5000	Frémy <i>et al</i> , 1981
	France	Fromage	21/257	12-510	Dragacci et Frémy, 1996
	Grèce	Lait	63/81	0,5-5	Markaki et Melissari, 1997
	Italie	Lait et dérivés	308/370	2-496	Galvano <i>et al</i> , 1998
	Portugal	Lait	85/101	5-51	Martins et Martins, 2000
	Suisse	Lait	55/393	50-3000	Tripet <i>et al</i> , 1981
Ochratoxine A	Allemagne	Lait	0/121	-	Valenta et Goll, 1996
	Norvège	Lait	11/107	11-58	Skaug, 1996
	Suède	Lait	5/36	10-40	Breitholtz-Emanuelsson, 1993

Tableau 4
Transfert de mycotoxines et/ou leur(s) métabolite(s) dans le lait de vache après ingestion d'aliments contaminés

Mycotoxines	Dose (mg.kg ⁻¹)/j	Traitement (jours)	lait	Taux (µg.kg ⁻¹)	Références
Aflatoxine	0,35	3	AFM1	0,10	Stubblefield <i>et al.</i> , 1983
Déoxynivalénol	1,8	1	DON	< 4	Prelusky <i>et al.</i> , 1984
Déoxynivalénol	66	5	DOM-1	2-26	Côté <i>et al.</i> , 1986
Déoxynivalénol	2,6	3	DOM-1	50-110	Prelusky <i>et al.</i> , 1987
	8	3	DOM-1	110-200	
Fumonisine B1	3	14	FB1	Nd	Richard <i>et al.</i> , 1996
Ochratoxine A	0,2	4	OTA	Nd	Ribelin <i>et al.</i> , 1978
	0,75		OTA	Nd	
	1,66		OTA	Nd	
	13		OTA	+	
			OTAα	+	
T2-toxine	50	15	T2-toxine	10-160	Robison <i>et al.</i> , 1979
Zéaralénone	25	7	zéaralénone	481	Mirocha <i>et al.</i> , 1981
			α-zéaralénol	508	
			β-zéaralénol	370	
Zéaralénone	0,1-0,33	21	zéaralénone	Nd	Prelusky <i>et al.</i> , 1990
			α-zéaralénol	Nd	

avérés très toxiques pour le rat alors qu'il n'a pas été mis en évidence d'aflatoxines (Kalayanatamir *et al.*, 1987). Ceci peut s'expliquer en partie par les différences inter espèces de toxicité constatées pour la plupart des substances toxiques. Par exemple, le rat peut dégrader de nombreuses mycotoxines alors que le cheval, le chien ou le poulet ne les métabolisent pas (Swanson *et al.*, 1988). De même les ruminants paraissent plus résistants aux toxines que les monogastriques, hypothèse qui laisse supposer un rôle détoxificateur du rumen par l'intermédiaire des protozoaires et des bactéries. L'administration de fortes doses de FB1 à différentes espèces animales n'entraîne pas d'effets cliniques significatifs chez les ruminants, alors que des altérations pathologiques et biochimiques sont observés chez le cheval et le porc (Osweiler, 1993). L'absence d'effets cliniques significatifs chez les ruminants, alors que des altérations pathologiques et biochimiques sont observés chez le cheval et le porc (Osweiler, 1993). L'absence d'effets cliniques pourrait s'expliquer par la disparition de la FB1 dans le rumen (Gurung *et al.*, 1999). D'autres études *in vitro* et *in vivo* ont montré l'efficacité du rumen dans la détoxification de certaines mycotoxines. Parmi ces mycotoxines, les trichothécènes (DAS, T2-toxine) sont métabolisés par les microorganismes du rumen (Kiessling *et al.*, 1984 ; Swanson *et al.*, 1987 ; Westlake *et al.*, 1987). Des résultats similaires ont été obtenus avec la zéaralénone (Kallela et Vasenius, 1982 ; Kiessling *et al.*, 1984). En revanche, Gurung *et al.*, (1999) montrent que la FB1 reste inchangée dans le liquide ruminal. Le déoxynivalénol (DON) est transformé *in vitro* dans le rumen de vaches (King *et al.*, 1984 ; Swanson *et al.*, 1987); alors qu'il n'est pas dégradé par le liquide intestinal de porc, ce qui pourrait expliquer la sensibilité de cet animal à cette toxine (He *et al.*, 1992). L'incubation *in vitro* de l'ochratoxine A (OTA) en présence de liquide de rumen a permis de montrer que l'hydrolyse de cette toxine en OTAα, beaucoup moins toxique, est rapide et complète entre 1,5 et 8 heures (Müller *et al.*, 1998). Dans certains cas, les protozoaires semblent jouer un rôle prépondérant dans ce processus de détoxification par rapport aux bactéries (Galtier et Alvinerie, 1976). Les mycotoxines non dégradées par le rumen se retrouvent dans la circulation générale et peuvent être excrétées dans le lait. L'OTA et son métabolite OTAα ne sont retrouvés ni dans le sang ni dans les urines après une ingestion unique par des vaches d'un aliment naturellement contaminé à 5 mg/kg (Kiessling *et al.*, 1984) alors que des concentrations significatives d'OTA sont retrouvées dans le sang (10 ng/ml) après une ingestion pro-

longée d'un aliment faiblement contaminé (2 mg/kg) (Höhler *et al.*, 1999). C'est sur ces observations que ce sont développées ces dernières années les nouvelles technologies de détoxification des mycotoxines. C'est ainsi que l'utilisation de culture de microorganismes en anaérobiose permanente pour détoxifier le DON a été évaluée (Binder *et al.*, 1997). De même une levure *Saccharomyces cerevisiae* a montré son efficacité comme détoxifiant, en particulier par sa fraction gluco-mannane estérifiée (GME), cette fraction va en effet se fixer aux toxines en formant une liaison non absorbable dans le tractus gastro-intestinal (Devegowda, 2001), et diminue ainsi leur biodisponibilité dans le sang. Cependant, la capacité de fixation du GME aux différentes mycotoxines testées est très inégale (Devegowda, 2001).

Une autre conséquence de la contamination des aliments pour animaux par les mycotoxines est la possibilité du transfert de ces toxines et/ou de leur(s) métabolite(s) dans les produits animaux notamment le lait. Parmi les mycotoxines excrétées dans le lait, l'aflatoxine M1 (AFM1) métabolite de l'AFB1 a été la plus étudiée. C'est une toxine hautement cancérigène et classée dans le groupe I des substances cancérigènes. De nombreuses enquêtes épidémiologiques ont permis de la mettre en évidence à l'état naturel dans le lait et ses dérivés (Tableau 3). L'OTA a été également retrouvée dans le lait des animaux (Tableau 3) mais aussi dans le lait humain (Breitholtz-Emanuelson *et al.*, 1993 ; Skaug *et al.*, 2001).

Des études expérimentales ont montré le passage d'autres mycotoxines et/ou de leur(s) métabolite(s) dans le lait (Tableau 4). La FB1 et son métabolite l'aminopentol, aussi dangereuse que l'AFB1, ne sont pas retrouvés dans le lait de vache après une ingestion d'aliments contaminés à des taux entre 1 et 5 mg.kg⁻¹ (Richard *et al.*, 1996b ; Scott *et al.*, 1994). En revanche, elle est retrouvée en faible quantité (0,14-0,57 ng.g⁻¹ de lait) après une administration IV de 30 mg de FB1 par vache (Hammer *et al.*, 1996). La présence de mycotoxines dans le lait et les produits dérivés pose un problème de santé publique du fait que ces produits sont largement consommés, notamment par les enfants pour lesquels ces aliments constituent l'alimentation de base, et qui s'avèrent plus sensibles à la toxicité de ces contaminants. Une autre source d'exposition de l'homme, est la présence de résidus de mycotoxines dans les tissus animaux comestibles

CONCLUSION

La contamination des fourrages par les moisissures s'effectue essentiellement au stade de la récolte et durant la conservation (Figure 1). Le premier aspect de la prévention contre ces contaminations et leurs effets néfastes commence par la mise en pratique de certaines recommandations générales au niveau de ces étapes (Boudra, 2002b). La gestion et l'évaluation des risques de contamination mycotoxique aux étapes sensibles se feront par une approche agronomique au stade de la récolte, et par une approche "processus de fabrication" lors de la conservation et de l'utilisation des fourrages.

Sur le plan scientifique, très peu de travaux ont été consacrés à la contamination mycotoxique des fourrages. Des travaux de recherche complémentaires sont donc à envisager sur :

- l'inventaire de la flore des fourrages verts et conservés
- la capacité des espèces retrouvées à se développer et à produire les mycotoxines correspondantes ;
- la stabilité durant la conservation de ces mycotoxines précédemment produites ;
- la capacité de détoxification du rumen vis à vis des principales toxines non encore envisagées dans différentes situations alimentaires
- et enfin, la possibilité de transfert de ces toxines dans les produits animaux, notamment le lait.

Almeida A. P., et al. 2002. J. Agric. Food. Chem., 50, 3877-3882
 Andrieu, J. P., et al. 1990. Product. Anim., 3, 67-73
 Auerbach, H., et al. 1998. J. Sci. Food Agric., 76, 565-572
 Bauer, J., et al. 1989. J. Med. Vet. Mycol., 27, 45-50
 Bauer, J., et al. 1983. MAN, 1, 203-209
 Belkacemi, L., et al. 1999. Med. Mycol., 37, 227-233
 Blanc, M. et Karleskind, A. 1981. Lait, 61, 481-499
 Bony, S., et al. 2001. 8^{ème} Rencontres Recherches Ruminants
 Boudra, H., et al. 1994. Mycopathologia, 127, 29-33
 Boudra, H., et al. 2002a. 9^{ème} Rencontres Recherches Ruminants
 Boudra, H. 2002b. Actes de la commission Plastique et Elevage
 Breitholtz-Emanuelsson, A., et al. 1993. J. AOAC Int, 76, 842-846
 Buchanan, J. R., et al. 1975. Appl. Microbiol., 30, 238-241
 Cole, R. J. et Cox, R. H. 1981. In Handbook of toxic metabolites
 Cole, R. J., et al. 1977. J. Sci. Food Agric., 826-830
 Corbion, B. et Fremy, J. M. 1978. Lait, LVIII, 133-140
 Côté, L. M., et al. 1986. J. Dairy Sci., 69,
 Craig, G. O., et Blythe, L. L. 2000. Rev. Méd. Vet., 151, 686
 Devegowda, G. 2001. Feeding Times, 6, 16-17
 Di Menna, M. E., et Parle, J. N. 1970. N. Z. J. agric. Res., 13, 51-68
 Dickens, J. W. et Welty, R. E. 1975. JAOCS, 52, 448-450
 Doyle, M. P. et Marth, E. H. 1978. Mycopathologia, 63, 145-153
 Dragacci, S. et Fremy, J. M. 1996. J. Fd. Protec, 59, 1011-1013
 Duphy, J. P. et Demarquilly, C. 1981. In Demarquilly C. (Editeur), Prévision de la valeur nutritive des aliments des ruminants. INRA, Theix. 81-88
 Durix, A., et al. 1998. Rev. Méd. Vet., 149, 528
 Dutton, M. F., et al. 1984. Mycopathologia, 87, 29-33
 Escoula, L. 1974. Ann. Rech. Vét., 5, 423-432
 Escoula, L. 1977. Fourrages, 69, 97-114
 Fennell, D. I., et al. 1973. Cereal Chem., 50, 404-414
 Fremy, J. M., et al. 1981. Ann. Fals. Exp. Chim., 74, 465-472
 Fremy, J. M., et Gaymard. 1980. Lait, LX, 635-644
 Galtier, P., et M. Alvinerie, A. 1976. Ann. Rech. Vét., 7, 1, 91-98
 Galvano, F., et al. 1998. J. Fd. Protec, 61, 738-741
 Gamanya, R., et Sibanda, L. 2001. Int. J. Food Microbiol., 71, 145-149
 Gareis, M., et al. 1984. Appl. Env. Microbiol., 47, 416-418
 Gareis, M., et Wernery, U. 1994. Mycot. Res., 10, 2-8
 Gregory, P. H., et al. 1963. J. Gen. Microbiol., 33, 147-174
 Gurung, N. K., et al. 1999. Vet. Hum. Toxicol., 41, 196-199
 Hacking, A., et Rosser, W. R. 1981. J. Sci. Food Agric., 32, 620-623
 Hale, O. M., et al. 1978. J. Ani. Sci., 47, 46-50
 Hamilton, P. B., et J. R. Harris. 1971. Poultry Sci., 50, 906-912

Hammer, P., et al. 1996. Milchwissenschaft, 51, 691-695
 He, P., et al. 1992. Appl. Env. Microbiol., 58, 3857-3863
 Heesch, W., et al. 1981. Reglementation et qualité, 1-8
 Higginbotham, G. E., et al. 1998. J. Dairy Sci., 81, 2185-2192
 Höhler, D., et al. 1999. J. Ani. Sci., 77, 1217-1223
 Kalayanatamitr, A., et al. 1987. Appl. Env. Microbiol., 53, 1980-1982
 Kallela, K., et L. Vasenius, L. 1982. Nord. Vet.-Med., 34, 336-339
 Kiessling, K. H., et al. 1984. Appl. Env. Microbiol., 47, 1070-1073
 King, R. R., et al. 1984. J. Agric. Food Chem., 32, 1181-1183
 Lacey, J. 1975. Trans. Br. Mycol. Soc., 65, 171-184
 Land, C. J., et al. 1987. Appl. Env. Microbiol., 53, 787-790
 Le Bars, J. 1976. Rev. Mycol., 40, 347-360
 Le Bars, J., et Labouche, C. 1979. Rev. Elev. Méd. Vét. pays tropicaux, 32, 57-63
 Le Bars, J., et Le Bars, P. 1989. Contamination par les moisissures des aliments pour animaux,
 Le Bars, J., et Le Bars, P. 1996. Vet. Res., 27, 383-394
 Le Bars, J., et al. 1994. J. AOAC Int, 77, 517-521
 Lillehoj, E. B., et al. 1972. Appl. Microbiol., 24, 198-201
 Magan, N., et Lacey, J. 1984. Trans. Br. Mycol. Soc., 82, 305-314
 Marin, S., et al. 1999. Fd Add. Contam., 16, 555-563
 Markaki, P. et Melissari, E. 1997. Fd Add. Contam., 14, 451-456
 Marsh, P. B., et al. 1969. J. Agric. Food Chem., 17, 462-467
 Martins, M. L., et Martins, M. H. 2000. Fd Add. Contam., 17, 871-874
 Mills, J. T. 1989. J. Fd. Prot., 52, 737-742
 Mirocha, C. J., et al. 1992. Appl. Env. Microbiol., 58, 3196-3198
 Mirocha, C. J., et al. 1981. Food Cosm. Toxicol., 19, 25-30
 Müller, H. M., et al. 1998. Natural Toxins, 6, 251-258
 Nout M. J. R., et al. 1993. J. Agric. Sci., 121, 323-326
 Oldenburg, E. 1993. Mycot. Res., 9, 72-78
 Osweiler, G. D., 1993. J. Anim. Sci., 71, 459-466
 Paster, N., et Menasherov, M. 1988. Appl. Env. Microbiol., 54, 540-543
 Pelhate, J. 1987. In fourrages secs: récolte, traitement, utilisation, INRA, Paris. 63-81
 Pier, A. C., et al. 1980. JAVMA, 176(8), 719-724
 Prelusky, D. B., et al. 1990. J. Env. Sci. Health, B25, 87-103
 Prelusky, D. B., et Trenholm, H. L. 1984. J. Env. Sci. Health, B19, 593-609
 Prelusky, D. B., et al. 1987. J. Env. Sci. Health, B22, 125-148
 Randby, A. T. 1996. XIth International Silage Conference,
 Ribelin, W. E., et al. 1978. Can. J. comp. Med., 42, 172-176
 Richard, J. L., et al. 1996a. Mycopathologia, 134, 167-170
 Richard, J. L., et al. 1996b. Mycopathologia, 133, 123-126
 Richard-Molard, D. 1989. In Contamination par les moisissures des aliments pour animaux, AFTAA, Toulouse. 7-11
 Robison, T. S., et al. 1979. J. Dairy Sci., 62, 637-641
 Sanchis, V., et al. 1988. J. Fd. Protec, 51, 289-292
 Schneewis, I., et al. 2000. Appl. Env. Microbiol., 66, 3639-3641
 Schneewis, I., et al. 2001. J. Anim. Physiol. Anim. Nut., 85, 38-44
 Scott, P. M., et al. 1994. J. Env. Sci. Health, B29, 989-998
 Shotwell, O. L., et al. 1972. Cereal Chem., 49, 458-465
 Skaug, M. A. 1999. Fd Add. Contam., 16, 75-78
 Skaug, M. A., et al. 2001. Fd Add. Contam., 18, 321-327
 Smith, D. F., et Lynch, G. P. 1972. J. Dairy Sci., 56, 828-829
 Stubblefield, R. D., et al. 1983. Am. J. Vet. Res., 44, 1750-1752
 Swanson, S. P., et al. 1988. Food Chem. Toxicol., 26, 823-829
 Swanson, S. P., et al. 1987. J. Chromatogr., 414, 335-342
 Sydenham, E. W., et al. 1990. J. Agric. Food Chem., 38, 285-290
 Towers, N. 1993. Scudamore, K.A. (Editor), Occurrence and significance of mycotoxins, London, UK. 16-26
 Tripet, F. Y., et al. 1981. Lait, 61, 634-637
 Ueno, Y., et al. 1993. Mycot. Res., 9, 27-34
 Valenta H., et Goll, M. 1996. Fd Add. Contam., 13, 669-676
 Weidenbörner, M. 2001. Eur. Food Res. Technol., 212, 262-273
 Westlake, K., et al. 1987. Appl. Env. Microbiol., 53, 587-592
 Wilson, D. M., et al. 1975. Appl. Microbiol., 30, 592-596
 Wilson, D. M., et Jay, E. 1975. Appl. Microbiol., 29, 224-228
 Wilson, D. M., et al. 1985. J. Stored Prod. Res., 21, 47-52