

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique*  
*Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou*  
*Faculté des Sciences Biologiques et des sciences Agronomiques*



## *Mémoire de fin de cycle*



*En vue de l'obtention du diplôme de master en Science Alimentaire*  
*Spécialité : Technologie Agroalimentaire et Contrôle de qualité*

### *Thème*

*Evaluation de la qualité  
microbiologique du pollen d'abeille sec*

*Realisé par :*

**M<sup>elle</sup> Issaoun Hayet**

**M<sup>elle</sup> Kacel Dalila**

*Proposé et dirigé par :*

**M<sup>r</sup> BENGANA M. (MCB)**

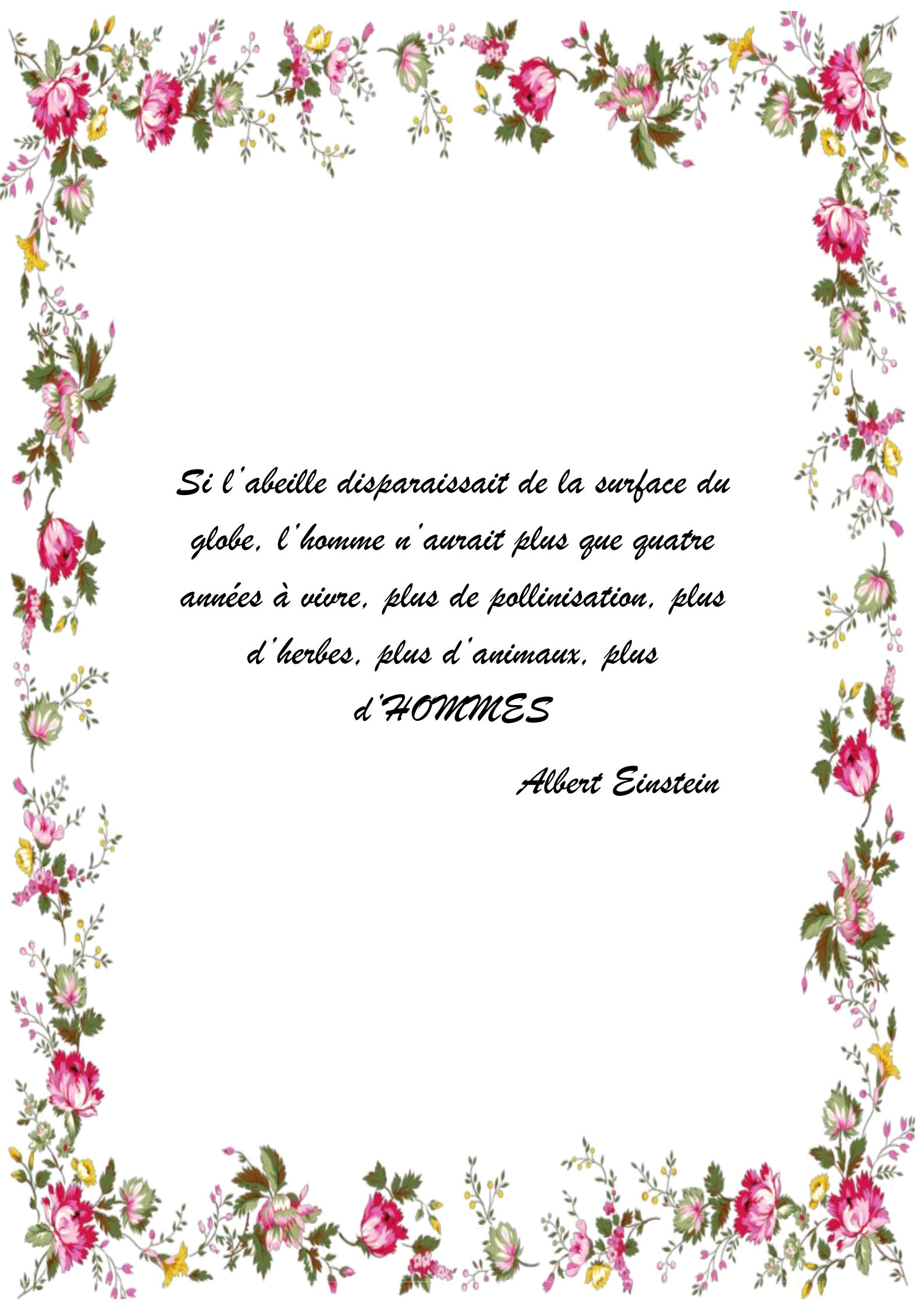
*Devant le jury :*

**Président : M<sup>r</sup> AMROUCHE T. (MCA)**

**Examineurs : M<sup>r</sup> SADOUDI R. (MCA)**

**M<sup>elle</sup> LAMMI S. (MCB)**

*Année universitaire : 2018-2019*



*Si l'abeille disparaissait de la surface du globe, l'homme n'aurait plus que quatre années à vivre, plus de pollinisation, plus d'herbes, plus d'animaux, plus d'HOMMES*

*Albert Einstein*



## Remerciements

Nous remercions le bon dieu pour nous avoir donné le courage et la volonté pour réaliser ce travail et qui nous a éclairé les chemins par la lumière de son immense savoir.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et notre vive connaissance à **M<sup>r</sup> BENGANA M.** Pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous accordé nous ont permet de réaliser ce travail.

Nous tenons également à le remercier de toute la patience dont il a su faire preuve au cours de la rédaction de notre mémoire.

Nos remerciements les plus sincères à **M<sup>r</sup> AMROUCHE T.** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Nous tenons à remercier également **M<sup>r</sup> SADOUDI R.** et **M<sup>elle</sup> LAMMI S.** Pour l'honneur qu'ils nous ont fait d'examiner ce travail.

Aussi, on voudrait exprimer cette reconnaissance à **M<sup>r</sup> METNA B.** qui nous a aidé, le remercier pour la disponibilité et les conseils, qu'il a su nous apporter.

## *Dédicace*

*A ma très chère mère qui s'est tant sacrifiée pour les besoins de nos études,*

*A mon très cher père pour tous les efforts consentis afin de nous armer du  
savoir,*

*A mes aimable sœurs et leurs maris Fazia et Kamel Fatima et Ali, Sara et  
Hocine*

*A mes chers frères Samir, Mourad, Hacene et sa femme Maya pour leur  
affectueux soutien moral,*

*A tous mes très chers et merveilleux amis (es) que je ne peux  
malheureusement pas tous citer (Lydia, Dalila, Nassima, Merieme et Malek),  
mon binôme Dalila et toutes sa famille*

*A tous les personnes qui m'ont bien aidé à atteindre mon objectif et a tous  
ceux que j'aime et qui m'aime*

*Hayet*

# *Dédicace*

*A mon très cher papa Ahmed,*

*Qui reste toujours mon premier maître, je t'aime très fort...,*

*A la plus belle perle du monde...ma tendre mère Ouerdia.,*

*En témoignage de votre affection, votre sacrifice et vos précieux conseils qui m'ont Conduit à la réussite dans tous ce que je fais, je t'aime maman*

*A mes chers frères Lounes, Mourad et Ferhat,*

*Qui n'ont cessé d'être pour moi l'exemple de persévérance, de courage et de générosité.*

*A mes aimables sœurs Melina et Ouiza et son mari Saïd et leur petit ange Aylane.,*

*Que dieu tout puissant, vous donne santé et bonheur. Je vous aime très fort*

*A mes chers cousins Mourad, Amar, Younes et Ghilas.,*

*Que dieu tout puissant, vous donne santé et bonheur. Je vous aime très fort*

*A mes très chères et merveilleuses amies.,*

*Que je j'aime profondément, Fariza, Sara, Lydia, Nassima, Hayat, Safia, Ouahiba et Lydia, je vous souhaite une vie pleine de bonheur, de prospérité et beaucoup de succès.*

*A ma binôme Hayet et sa famille.,*

*Que dieu tout puissant, vous donne santé et bonheur. Je vous aime très fort*

*A tous mes proches.,*

*A tous ceux qui mon aidé afin de réaliser ce travail, et à tous ceux que j'aime et qui m'aiment.*

*Dalila*

## Liste des abréviations

**AG:** Acide gras

**AGS :** Acide gras saturé

**AGPI :** Acide gras polyinsaturé

**AA :** Acide aminé

**FMAT:** Flore mésophile aérobie totale

**g :** Gramme

**IHC :** International honey commission

**MRS :** Man, Rogosa, Sharpe

**OGA :** Oxytétracycline glucose Agar

**OTA :** Ochratoxine

**PCA :** Plate Count Agar

**PSS :** Pollen sec stocké

**PSF :** Pollen sec frais

**UE :** Union Européenne

**UFC :** Unité formant colonie

**UV :** Ultraviolet

**VRBL :** Violet Red Bile Lactose Agar

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Origine du pollen.....	3
<b>Figure 2:</b> Structure de grain de pollen. ....	4
<b>Figure 3:</b> Trappe à pollen.....	22
<b>Figure 4:</b> Dilution en série de l'échantillon dans une solution physiologique.....	26
<b>Figure 5:</b> Etalement de la suspension diluée sur les milieux de culture. ....	29
<b>Figure 6 :</b> Image microscopique d'un mycélium du genre <i>Rhizopus spp</i> prélevé de l'échantillon du PSF de la dilution $10^{-2}$ .....	41
<b>Figure 7 :</b> Image microscopique d'un mycélium du genre <i>Rhizopus spp</i> prélevé de l'échantillon du PSS de la dilution $10^{-3}$ . ....	41
<b>Figure 8 :</b> Image microscopique d'un mycélium du genre <i>Alternaria spp</i> prélevé de l'échantillon du PSF de la dilution $10^{-3}$ . ....	42
<b>Figure 9 :</b> Image microscopique d'un mycélium du genre <i>Aspergillus spp</i> prélevé de l'échantillon du PSF de la dilution $10^{-2}$ . ....	43
<b>Figure 10 :</b> Image microscopique d'un mycélium du genre <i>pénicillium spp</i> prélevé de l'échantillon du PSF de la dilution $10^{-2}$ . ....	43
<b>Figure 11 :</b> Image microscopique d'un amas de cellules caractérisant les levures prélevé del'échantillon du PSF de la dilution $10^{-3}$ .....	44

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Teneur en acides aminés en mg pour 100mg de pollen. ....	7
<b>Tableau II</b> : Quelques vitamines présentes dans le pollen en mg /100g et les apports journaliers recommandés mg /jour.....	9
<b>Tableau III</b> : Normes des contaminants dans le pollen .....	20
<b>Tableau IV</b> : Résultats de la teneur en eau en pourcentage (%) des deux types du pollen d'abeille. ....	31
<b>Tableau V</b> : Résultats des valeurs du pH des deux types du pollen d'abeille. ....	32
<b>Tableau VI</b> : Résultats de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (UFC/g) des deux types du pollen d'abeille .....	34
<b>Tableau VII</b> : Résultats de dénombrement des coliformes totaux (UFC/g) des deux types du pollen d'abeille. ....	35
<b>Tableau VIII</b> : Résultats de dénombrement des coliformes fécaux (UFC/g) des deux types du pollen d'abeille.....	37
<b>Tableau IX</b> : Résultats de dénombrement de la flore lactique(UFC/g)des deux types du pollen d'abeille.....	38
<b>Tableau X</b> : Résultats de dénombrement des staphylocoques et des salmonelles (UFC/g) des deux types du pollen d'abeille. ....	39
<b>Tableau XI</b> : Résultats de dénombrement des levures et moisissures(UFC/g) des deux types du pollen d'abeille. ....	40



**Sommaire**

# Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

## Synthèse bibliographique

**Introduction ..... 1**

### **Chapitre I : Le pollen des fleurs et le pollen d'abeilles**

**1.1. Le pollen des fleurs ..... 3**

1.1.1. Définition et origine ..... 3

1.1.2. Présentation du pollen ..... 3

1.1.3. Structure du pollen ..... 4

1.1.4. Pollinisation et types de pollen ..... 5

    a. les pollens anémophiles..... 5

    b. les pollens entomophiles ..... 5

**1.2. Le pollen d'abeille ..... 6**

1.2.1. Caractéristiques du pollen récolté par les abeilles ..... 6

1.2.2. Composition chimique du pollen ..... 6

1.2.3. Valeur nutritionnelle et thérapeutique ..... 11

## **Chapitre II : Le pollen d'abeille : Microbiologie, Altérations et Conservation**

<b>2.1. La microbiologie du pollen d'abeille .....</b>	<b>14</b>
2.1.1. Microorganismes présents dans le pollen .....	14
2.1.2. Les microorganismes associés au pollen floral, corbiculaire et au pain d'abeille .....	14
2.1.3. Le rôle des microorganismes du pollen .....	15
<b>2.2. Altération du pollen d'abeille .....</b>	<b>16</b>
2.2.1. Définition .....	16
2.2.2. Les facteurs influençant l'altération du pollen.....	16
2.2.2.1. Les contaminants biologiques et microbiologiques .....	16
2.2.2.2. Les contaminants physiques .....	17
2.2.2.3. Les contaminants chimiques .....	17
2.2.3. Les normes des contaminants dans le pollen .....	19
<b>2.3. Récolte et conservation du pollen d'abeille .....</b>	<b>20</b>
2.3.1. La récolte du pollen .....	20
2.3.1.1. Par les abeilles.....	20
2.3.1.2. Par l'apiculteur.....	21
2.3.2. Nettoyage .....	22
2.3.3. Techniques de conservation.....	23
2.3.3.1. Congélation.....	23
2.3.3.2. Séchage .....	23
2.3.4. Modes de conditionnement du pollen .....	24
<b>La partie expérimentale .....</b>	<b>24</b>
<b>I. Matériel et Méthodes.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1. Echantillonnage.....</b>	<b>24</b>

<b>1.2. Analyses physicochimiques .....</b>	<b>24</b>
1.2.1. La teneur en eau .....	24
1.2.2. Le pH .....	25
<b>1.3. Analyses microbiologiques .....</b>	<b>25</b>
1.3.1. Préparation de la suspension mère (SM) .....	25
1.3.2. Recherche et dénombrement des germes .....	26
1.3.2.1. Flore mésophile aérobie totale (FMAT) .....	26
1.3.2.2. Coliformes totaux et fécaux .....	26
1.3.2.3. La flore lactique .....	27
1.3.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
1.3.2.5. <i>Salmonella</i> .....	28
1.3.2.6. Levures et moisissures .....	28
<b>1.4. Observation microscopique.....</b>	<b>29</b>
<b>1.5. Analyse statistique .....</b>	<b>29</b>
<b>II. Résultats et discussion .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Résultats des analyses physicochimiques.....</b>	<b>31</b>
2.1.1. La teneur en eau .....	31
2.1.2. Le pH .....	32
<b>2.2. Résultats des analyses microbiologiques.....</b>	<b>33</b>
2.2.1. La flore mésophile aérobie totale : FMAT .....	33
2.2.2. Coliformes totaux.....	35
2.2.3. Coliformes fécaux.....	36
2.2.4. La flore lactique .....	37
2.2.6. La flore pathogène .....	38

• Les Staphylocoques.....	38
• Les salmonelles .....	38
2.2.7. Levures et moisissures .....	39
<b>2.3. Résultats de l'observation microscopique .....</b>	<b>41</b>
<b>2.4. Discussions des résultats microscopiques .....</b>	<b>45</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>46</b>

### **Références bibliographiques**

**Annexes**

**Résumé**

**Abstract**



**Introduction**

### Introduction

L'apiculture est l'une des activités les plus anciennes de l'agriculture. Selon **Louveaux (1985)**, l'apiculture est l'élevage des abeilles dans le but d'en tirer des productions dotées d'une valeur marchande. Elle a évolué de pair avec la société humaine pour répondre aux besoins de cette dernière.

L'Algérie possède des capacités mellifères très abondantes et variées et un climat favorable pour toute exploitation apicole. Les apiculteurs algériens produisent principalement du miel, toute fois une partie d'entre eux s'intéressent à la production des autres produits de la ruche tels que la gelée royale, le pollen et la propolis (**Oudjet, 2012**).

De nos jours, les produits apicoles (miel, gelée royale, propolis, cire ou pollen d'abeille) gagnent une grande importance en raison de la présence de composés bioactifs associés à des propriétés bénéfiques pour la santé. Le pollen d'abeille en particulier attire l'attention en tant qu'aliment fonctionnel pour la consommation humaine en raison de sa teneur élevée en composés ayant des effets bénéfiques pour la santé (**Ares et al., 2018**), tels que les acides aminés essentiels, les composés phénoliques, les vitamines et les pigments qui peuvent agir comme des antioxydants puissants (**Kieliszek et al., 2017**). Par conséquent, la demande commerciale de pollen d'abeille par le consommateur a augmenté ces dernières années. Des pays tels que l'Espagne, la Chine, l'Australie et l'Argentine sont les principaux producteurs de pollen d'abeille (**Moreno et al., 2018**).

Cependant, la consommation du pollen en Algérie reste très limitée, malgré ses effets bienfaits remarquables sur l'organisme ; ainsi que sa valorisation comme produit alimentaire n'est pas encore mise en place, et ce malgré la diversité et la richesse de la flore caractérisant notre pays et les potentialités de production du pollen de trappe.

Eckert et Ferrar (1934) étaient les premiers à développer l'idée d'un dispositif de récolte, mais ce sont Todd et Bishop (1940) qui le modifiaient et conçoivent une trappe comportant comme piège un double grillage métallique de 5 mailles au pouce (**Louveaux, 1968**).

Une fois récolté, le pollen subit l'un des deux modes de traitement et de conservation qui coexistent. Il peut être séché pendant quelques heures par un courant d'air chaud et sec (température maximale 45°C) ce qui permet sa conservation à température ordinaire, cependant il est couramment considéré qu'il perd environ 50% de sa valeur thérapeutique. Il

peut être également congelé, un moyen qui permet une conservation presque totale de sa valeur nutritive.

Le pollen est un produit particulièrement sensible, s'il est mal conditionné, il peut présenter de réels risques alimentaires. L'association de microbes avec le pollen est un problème qui affecte l'utilité du pollen d'abeille en tant que produit alimentaire pour l'homme et dans le contexte commercial. Les caractéristiques structurelles et nutritionnelles du pollen d'abeille, ainsi que le potentiel de contact avec l'environnement et d'autres insectes pendant la production, font du pollen d'abeille un microhabitat favorable à de nombreux microorganismes (**Moreno et al., 2018**).

A cet effet, le contrôle de la qualité microbiologique du pollen produit et commercialisé par les apiculteurs est primordial (**Belhadj et al., 2012**).

Notre étude est consacrée à l'analyse de la qualité microbiologique de différents échantillons de pollen sec stocké (2018) et de pollen sec frais (2019). Ce genre d'analyse microbiologique est indispensable non seulement pour assurer une bonne qualité hygiénique et une bonne conservation mais aussi pour garantir la sécurité sanitaire du consommateur.



# **Chapitre 1**

Pollen des fleurs et pollen  
d'abeille

## 1.1. Pollen des fleurs

### 1.1.1. Définition et origine

Le terme pollen vient du grec «Palé» qui signifie « farine ou poussière » (Amigou, 2016). Les grains de pollen sont issus de tissu sporogène des sacs polliniques des plantes (Gharbi, 2011). C'est un gamétophyte, donc un producteur de gamètes, contenu dans l'anthere de la plante à l'extrémité des étamines (Nicolson, 2011).

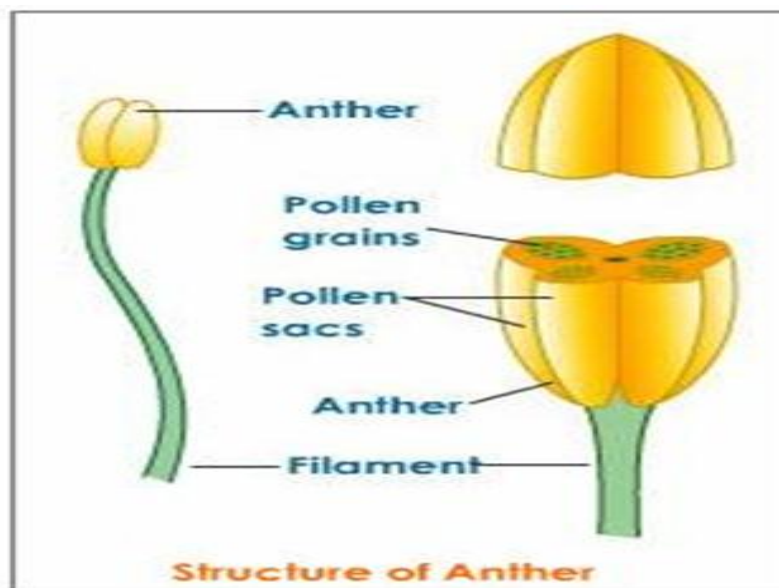


Figure 1 : Origine du pollen (<https://carahanna97.weebly.com>)

### 1.1.2. Présentation du pollen

Il se présente sous forme d'une fine poussière dont la couleur varie selon la plante d'origine en allant du blanchâtre au rose, du jaune au vert et du rouge au marron foncé (Ravazzi, 2003). Le pollen, petits éléments sphériques ou ovoïdes, qui mesure 2,5 à 220 microns. Il est « l'empreinte digitale » de la fleur puisque chaque plante à fleurs en produit un type spécifique (Donnadieu, 1983 ; Blanc, 2010).

Les pollens sont formés de deux noyaux et de cytoplasme entourés par une couche interne fine appelée intine et une paroi plus rigide et/ou plus épaisse appelée exine (Nicolson et al., 2011). Ce sont des grains microscopiques que l'abeille va récolter en se frottant sur les fleurs, leur forme est différente suivant les espèces végétales (Cherbuliez, 2001). La même fleur est d'ailleurs prospectée plusieurs fois (Roulston, 2000). Chaque petit grain est une unité biologique parfaite et complète possédant tout ce qui est nécessaire à la vie : protéines,

vitamines, sucres, vingt et un des vingt-trois acides aminés connus, lipides, hydrates de carbone, enzymes, coenzymes et hormones de croissance sans oublier les sels minéraux (Ravazzi, 2003).

### 1.1.3. Structure du pollen

La cellule du pollen est ce que l'on nomme familièrement "le grain de pollen" ou étymologiquement " grain de poussière". Il est la cellule fécondante des plantes à fleurs, libérée par déhiscence des sacs polliniques lorsque les anthères arrivent à la maturité. Il mesure quelques microns et est donc invisible à l'œil nu. Il en va sans dire que s'il veut résister à son voyage dans les airs seul ou porté par un pollinisateur (abeilles, bourdons, ou encore chauve-souris dans certains pays), il doit résister au vent, aux UV, à la pluie, à l'oxydation, d'où sa composition complexe. La gangue protectrice ou paroi pollinique du grain de pollen protège le gamétophyte mâle pendant son voyage de l'anthère jusqu'au stigmate. Il est donc constitué de plusieurs couches : l'intine et l'exine (Thibault, 2017).

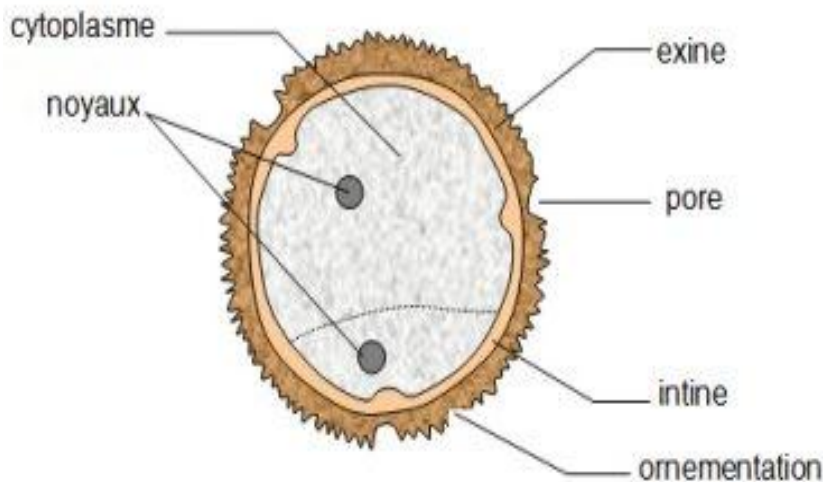


Figure 2 : Structure du grain de pollen (<https://tse1.mm.bing.net>)

L'exine, rigide, a un rôle de protection, elle empêche l'usure du grain de pollen en le protégeant des écrasements et autres effractions. Elle a un aspect différent selon les espèces et présente par ce fait une grande utilité dans la caractérisation du pollen mais également en archéologie et palynologie car elle fossilise dans le sol et devient un représentant de son espèce dans les sols. Son aspect varie d'une espèce à l'autre. Cette couche est principalement composée de sporopollénine, un bio polymère extrêmement résistant. La surface et les anfractuosités de l'exine sont tapissées et comblées par une substance majoritairement lipidique, on le nomme manteau pollinique. C'est ce manteau pollinique gluant qui favorise

l'adhésion du pollen au corps des pollinisateurs et assure la cohésion des pelotes confectionnées par l'abeille. Cette couche est également dotée de piquants s'accrochant aux poils de l'abeille. Malgré la présence de cire à la surface, les abeilles sont capables de la digérer pour en faire du pain d'abeille ou de la gelée royale destinés aux jeunes larves (**Thibault, 2017**).

L'intine est une membrane semi-perméable, fine, entourant le cytoplasme (**Dajoz, 1993**). La couche intérieure de la paroi, l'intine, semble contenir les enzymes nécessaires à la germination du tube pollinique, à la pénétration de la cuticule du stigmate et à la croissance subséquente à travers le stigmate (**Laurian et al., 2004**). L'intine, est quant à elle beaucoup plus fragile. C'est à elle que l'on doit la majeure partie des propriétés du pollen puisqu'elle est constituée de matières grasses gélifiées et colorées très riches en caroténoïdes, arômes, polyphénols, flavonoïdes et en vitamines anti oxydantes liposolubles. De nature pecto-cellulosique et entoure la cellule végétative (**Thibault, 2017**).

#### **1.1.4. Pollinisation et types de pollen**

La pollinisation est une fécondation assurée au moment de floraison, où il y'aura l'ouverture de l'anthere pour libérer le pollen qui va rencontrer le stigmate des pistils afin d'atteindre l'ovaire. Elle peut être soit directe (autofécondation) ou bien indirecte (croisée). Cette dernière assure deux types de pollen, les pollens anémophiles et entomophiles (**Darrigol, 1979**).

##### **a. Les pollens anémophiles**

Les pollens anémophiles sont plutôt produits par des végétaux à fleurs inodores et se propagent dans l'atmosphère, ils rentrent donc facilement en contact avec la muqueuse oculaire et nasale inhalés par les voies respiratoires. Ces pollens sont plus abondants et sont à l'origine des réactions allergiques (**Darrigol, 1979**).

##### **b. Les pollens entomophiles**

Qui sont surtout produits par des végétaux à fleurs colorées et parfumées, ces types de pollen se propagent peu dans l'atmosphère car ils sont particulièrement transportés par les insectes et notamment les abeilles (**Darrigol, 1979**).

## **1.2. Le pollen d'abeille**

### **1.2.1. Caractéristiques du pollen récolté par les abeilles**

Le pollen est récolté par les abeilles durant presque de toute l'année. C'est la seule source naturelle en matière azotée de la ruche (**Prost et le Conte, 2005**). Le pollen d'abeille se présente sous forme de « pelotes ». Le pollen correspond à la partie protéique de l'alimentation des abeilles, il est indispensable pour la nourriture des larves. Le pollen est la matière première pour la production de la gelée royale et des œufs. Les besoins en pollen d'une colonie d'abeille normale sont de 35 à 40 kg environ par an (**Biri, 2003**). Les abeilles transforment les pelotes auxquelles elles mélangent des enzymes qui vont permettre de dissoudre la solide enveloppe qui enferme les éléments nutritifs à l'intérieur de chaque minuscule grain de pollen, cette diversité en nutriments fait du pollen un complément alimentaire tonifiant et revitalisant de tout premier ordre (**Roulston, 2000**).

Une pelote pèse de 20 à 25mg, elle contient 3 à 4 millions de grains de pollen (**Roulston, 2000**). La couleur, l'apparence, l'odeur et le goût du pollen varient fortement selon l'origine des plantes butinées (**Biri, 2002**).

- **Couleur** : le plus souvent jaune ; il existe aussi des pollens dans les nuances de couleurs les plus diverses (par exemple : orange, rouge, bleu, violet).
- **Apparence** : gros grains (pelotes de pollen).
- **Odeur** : semblable au foin.
- **Goût** : doux, acide, amer, fort.

Il faut être attentif aux défauts typiques, comme les odeurs et les goûts étranges dus à la fermentation, à des moisissures par ex. Moisi, fermenté, rancis et aux contaminants (**Compos et al., 2008**).

### **1.2.2. Composition chimique du pollen**

La composition du pollen est très variable, principalement en fonction des plantes visitées par les abeilles mais également en fonction de l'origine géographique (**Bogdanov, 2014**). Surtout en ce qui concerne sa teneur en protéines (**Philippe, 1999**).

### 1.2.2.1. Eau

La teneur en eau est différente selon que l'analyse est pratiquée avant ou après séchage en vue de sa bonne conservation. On retrouve environ 4% d'eau dans le pollen asséché et 20 à 25% dans le pollen frais (**Donadieu, 1983 ; Blanc, 2010**).

### 1.2.2.2. Protéines

Le pollen est considéré comme un aliment protéinique avec un pourcentage moyen de 20%, dont une grande partie se trouve sous forme d'acides aminés (ou aminoacides) (tableau I). Il contient les huit acides aminés indispensables à la vie que notre organisme ne peut pas synthétiser (la méthionine, la leucine, la thréonine, la phénylalanine, l'isoleucine, la lysine, le tryptophane et la valine) (**Donadieu, 1983**), ainsi que tous les acides aminés semi essentiels (**Gharbi, 2011**).

Le taux de protéines est variable d'une espèce de plante à une autre. On estime à 5% la teneur des plantes les moins riches et 40% celles les plus riches soit en moyenne 10 à 40 grammes pour 100 grammes de pollen sec. Cette différence explique en partie pourquoi les abeilles se dirigent préférentiellement vers certaines plantes pour la récolte du pollen. Cette teneur va dépendre également des conditions climatiques, c'est pourquoi d'une région à une autre une plante de la même espèce aura une composition variable. En exemple, le maïs peut contenir de 21,28 à 26,08 % de protéines (**Almeida et al., 2005 ; Campos et al., 2010**).

**Tableau I : Teneur en acides aminés en mg pour 100mg de pollen (Da Silva et al., 2014)**

Teneur en acide aminés	Echantillon 2009 (mg/g pollen)	Echantillon 2011 (mg/g pollen)
Asparagine	0,80	1,04
Serine	3,72	4,27
Glutamine	0,20	0,21
Glycine	0,37	0,36
Histidine	0,73	0,70
Arginine	0,32	0,30
Thréonine	0,30	0,23
Alanine	0,91	0,93
Proline	11,79	9,54
Cystéine	-	-

<b>Tyrosine</b>	0,41	0,32
<b>Valine</b>	0,41	0,29
<b>Méthionine</b>	0,17	0,14
<b>Lysine</b>	0,53	0,32
<b>Isoleucine</b>	0,21	0,14
<b>Leucine</b>	0,61	0,61
<b>Phénylalanine</b>	0,41	0,36
<b>Mannitol</b>	208,0 mg	310,0 mg

### 1.2.2.3. Glucides

Le pollen apicole est composé du pollen mélangé au nectar, source de carbohydrates, et aux sécrétions salivaires des abeilles. Des études sur différents extraits de pollen ont démontré qu'ils étaient riches en sucres monomères et dimères (**Qian et al., 2008**). Les glucides sont les composants principaux du pollen. Une grande partie de ces composés sont des polysaccharides comme l'amidon, la pectine et la cellulose. On y trouve aussi du fructose, glucose et saccharose qui représentent environ 90 % de toutes les sortes des sucres à bas poids moléculaire, bien que les proportions des différents sucres varient d'une plante à l'autre (**Bogdanov, 2006**).

### 1.2.2.4. Lipides

Le pollen contient également des lipides, entre 1 et 10%. On les trouve dans le manteau pollinique et le cytoplasme de la cellule végétative. Les corps gras d'origine végétale ou animale sont des triesters du glycérol et d'acides acycliques à longue chaînes linéaires, ce sont les acides gras. Ces acides gras sont importants pour la reproduction, le développement et la nutrition des abeilles. Les plus représentés sont par ordre décroissants : l'acide linoléique (W3), l'acide palmitique (AGS) et l'acide linoléique (W6). Les pollens ayant les taux les plus élevés, notamment en acides gras linoléiques, linoléiques, myristiques et dodécanoïques interviendraient dans l'inhibition de microorganismes pathogènes (**Human et Nicolson, 2006**).

### 1.2.2.5. Vitamines

Le pollen contient des vitamines en grand nombre, les plus abondantes sont du groupe B (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, B9, B12), de la provitamine A ou  $\beta$ -carotène. Par ailleurs, des

très faibles quantités de vitamine C, vitamine D et E sont retrouvés (Sauvager, 2012). ; Voici quelques teneurs de pollen en vitamines représentées dans le tableau II :

**Tableau II : Quelques vitamines présentes dans le pollen en mg /100g et les apports journaliers recommandés mg /jour (Massaux, 2016).**

Vitamines	Mg/100g	Apport journalier recommandé mg/jour
<b>β-carotène provitamine A</b>	1-20	0,9
<b>B1 (thiamine)</b>	0,6-1,3	1,1
<b>B2 (riboflavine)</b>	0,6-2,6	1,3
<b>B5 (acide pantothénique)</b>	0,5-2	6
<b>B6 (pyroxidine)</b>	0,2-0,7	1,4
<b>C (acide ascorbique)</b>	7-56	100
<b>H (biotine)</b>	0,05-0,07	0,045
<b>Acide folique</b>	0,3-1	0,4
<b>E (tocophérol)</b>	4-32	13

#### 1.2.2.6. Substances minérales et oligo-éléments

La concentration en minéraux est environ 5 %, elle varie en fonction de l'origine florale et de la saison (Amigo, 2016). Les éléments présents sont le calcium, le chlore, le cuivre, le fer, le magnésium, le manganèse, le phosphore, le potassium, le silicium, le soufre, ainsi que le sélénium, un antioxydant très rare (Dancy, 2015).

#### 1.2.2.7. Caroténoïdes

Les Caroténoïdes sont représentés par les carotènes et les xanthophylles, qui par convention sont traités avec la vitamine A. Les carotènes sont des composés terpéniques, constitués d'une ou deux molécules de la vitamine A tête-bêche. C'est un pigment qui apporte leur couleur orange aux pollens. Les xanthophylles possèdent au moins une molécule d'oxygène dans leur structure contrairement aux carotènes qui sont strictement hydrocarbonés. Ils sont retrouvés en grande quantités dans les cellules végétales et en particulier dans les pétales jaunes, orange et rouges. En effet, les xanthophylles sont également de couleur jaune. La portion quotidienne recommandée de 25 g de pollen d'abeille sec fournirait 162 µg de

rétinol, soit 18 % de l'apport quotidien recommandé pour les hommes et 23% pour les femmes (Melo et Almeida, 2010).

#### **I.2.2.8. Composés phénoliques**

Les polyphénols sont des composants du pollen qui contribuent en partie à son pouvoir antioxydant. La composition est variable en fonction de l'origine botanique, on les retrouve en moyenne entre 3 et 5%. Ces polyphénols peuvent être différenciés en flavonoïdes et en acides phénoliques.

Les acides phénoliques sont présents dans le pollen à des teneurs proches de 0,19% (quelque peu variable en fonction des études). Quelle que soit la molécule, un acide phénolique est composé d'un noyau aromatique et d'un groupement carboxyle. Les acides phénoliques les plus couramment identifiés dans le pollen sont les acides chlorogéniques, galliques, feruliques et cinnamiques, p-coumariques et caféiques (Fanali et *al.*, 2013).

Les flavonoïdes sont présents dans le pollen principalement sous forme de glycosides. Les principaux flavonols présents dans le pollen sont la quercétine et le kaempférol. Dans une étude, l'isoquercétine, la quercétine et l'isorhamnétine sont retrouvées dans plus de 90% des échantillons de pollen brésiliens testés (sur un total de 22 échantillons). Cela suggère que ces flavonoïdes ne sont pas spécifiques de l'espèce botanique. Dans un échantillon de pollen mono floral d'*Eucalyptus globulus*, on identifie la myricétine, tricétine et luteoline. Les flavonoïdes sont en partie responsables de la coloration des grains de pollen (du rouge au violet). La couleur dépend de leur structure et donc de la composition du pollen en flavonoïdes par exemple la couleur jaune est apportée par les flavonols, le violet par les anthocyanosides (**Morais et al., 2011**).

Les phytostérols sont des constituants naturels des végétaux ayant une structure proche du cholestérol. Le pollen contient de 0,1 à 0,4% de stérols ayant des propriétés biologiques différentes. On a isolé le  $\beta$ -sitostérol, le brassicastérol, le stigmastérol et le fucostérol (**Precie, 2009**).

#### **I.2.2.9. Substances diverses**

Le pollen renferme un certain nombre d'enzymes telles que l'amylase et la catalase qui proviennent des sécrétions salivaires ajoutées par les abeilles, l'invertase, et certaines phosphatases (**Massaux, 2016**).

- Une substance accélératrice de la croissance et des substances antibiotiques actives sur toutes les souches de *Colibacilles* et certaines de *Proteus* et *Salmonelles*.
- la rutine qui augmente la résistance capillaire.
- On y trouve aussi des coenzymes, stérols, des arômes et des huiles volatiles, et de nombreux pigments.
- Un très faible pourcentage de substances encore indéterminées et qui peuvent avoir une grande importance (**Donadieu, 1983 ; Sebaaoui, 2009**).

#### **I.2.3. Valeur nutritionnelle et thérapeutique**

Le pollen est un supplément nutritionnel très précieux pour les êtres humains en raison de la variété de ses principaux constituants (**Bradbear, 2010**). L'action du pollen sur l'organisme humain a été étudiée tout particulièrement depuis 1950. De nombreuses communications scientifiques relatives au pollen affirment que ses effets bienfaits sont nombreux et bien marqués (**Prost et le Conte, 2005**).

➤ **Action tonifiante, stimulante et métabolique du pollen**

Le pollen, grâce à sa constitution, est bénéfique en cas de carences en vitamines, minéraux, acides aminés notamment lors de la grossesse ou de l'allaitement. Il permet aussi de renforcer l'organisme lors de certaines affections comme la grippe saisonnière (**El Hady et al., 1986**). Le pollen participerait à réguler l'alimentation des personnes obèses ou maigres (**Bogdanov, 2014**).

➤ **Action antioxydant**

La richesse du pollen en antioxydants (provitamine A, vitamines E et C, sélénium, flavonoïdes) lui confère une action de « free radical scavenger ». Le pollen est l'aliment naturel le plus riche en sélénium qui est un cofacteur pour la glutathion peroxydase, agit contre le vieillissement accéléré des cellules en éliminant les radicaux libres et le peroxyde d'hydrogène, causes de maladies cardio-vasculaires ou de cancers (**Apimondia, 2001 ; Nagai et al., 2002**).

➤ **Action antibactérienne du pollen**

Des études ont démontré l'effet bactériostatique et bactéricide des pollens quel que soit leur origine géobotanique. In-vitro, la croissance de certaines souches est inhibée : *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (**Apimondia, 2001**).

➤ **Action digestive et anti-inflammatoire du pollen**

Riche en protéines et en acides aminés, le pollen déclenche une forte sécrétion gastrique d'acide lors de son ingestion. Egalement, la microflore apportée par celui-ci aiderait à, l'équilibre de la flore intestinale et assurerait le transit grâce à la présence d'amidon et de fibres alimentaires celluloses. De plus, il exercerait une action anti-inflammatoire selon une étude menée chez le rat (**Bogdanov, 2014**).

➤ **Action cardio-vasculaire du pollen**

Chez l'animal, on a observé une diminution de l'agrégation plaquettaire, de la Cholestérolémie et de l'épaisseur de la plaque athéromateuse au niveau des artères. Ceci est possible grâce à la présence de vitamines B6 et B9 bénéfiques dans l'artériosclérose et de rutine qui prévient la formation des caillots sanguins. L'association de vitamine E, de potassium, de magnésium et de la faible teneur en sodium contribue également à son action cardio-protectrice (**Cherbuliez et Domerego, 2003**).

### ➤ **Autres utilisations du pollen**

Le pollen est utilisé pour les programmes de sélection des plantes, pour la pollinisation, il peut être stocké pour nourrir les abeilles en période de pénurie, il peut aussi servir à l'étude des réactions allergiques tels que le rhume, et pour le suivi de la pollution environnementale par le dosage des métaux lourds (**Bradbear, 2010**).



## **Chapitre 2**

# **Le pollen d'abeille : Microbiologie, Altération et Conservation**

## 2.1. La microbiologie du pollen d'abeille

### 2.1.1. Microorganismes présents dans le pollen

On trouve dans le pollen en pelotes des microorganismes très divers, mise à part la présence des germes sporulés et des moisissures que nous considérons comme accidentelles tant dans le pollen en pelotes que dans le pollen stocké, la flore microbienne significative et constituée de 3 groupes, selon **Pain et Maugenet (1966)** :

- Le premier groupe est formé de bactéries aérobies, Gram négatif non sporulées voisines du genre des *Pseudomonas*.
- Le second groupe de bactéries est représenté par des fins bâtonnets, Gram positif, micro-aérophiles, ces bactéries appartiennent au genre de *Lactobacillus*.
- Le dernier groupe comprend des levures à caractère osmophile appartenant au genre *Saccharomyces*.

### 2.1.2. Les microorganismes associés au pollen floral, corbiculaire et au pain d'abeille

Le pollen d'une fleur change microbiologiquement et biochimiquement dès qu'une abeille le récupère. Les abeilles humidifient le pollen avec du nectar régurgité ou du miel pour faciliter leur tassement dans les corbicules, ajoutent des sécrétions glandulaires et l'inoculent avec des microorganismes. Les champignons (moisissures et levures) et *Bacillus spp* sont les microorganismes prédominants dans le pollen et le pain d'abeille (**Gilliam, 1997**).

D'autres espèces sont aussi introduites dans le pollen par les abeilles : la levure *T. magnoliae*, les bactéries appartenant au genre *Bacillus* et les moisissures *Aureobasidium pullulans*, *P. corylophilum*, *P. crustosum* et *Rhizopus nigricans*. La plupart des organismes isolés à partir du pollen corbiculaire et de pain d'abeille étaient également associés à des colonies d'abeilles mellifères, en particulier dans les entrailles des abeilles ouvrières adultes (**Gilliam et Prest, 1987 ; Gilliam et al., 1988 ; Gilliam et al., 1989 ; Gilliam, 1979 ; Gilliam et al., 1989**).

Une succession de flore microbienne s'est produite en raison de l'ajout par les abeilles de microorganismes qui ont remplacé un bon nombre de ceux associés au pollen floral. Les bactéries, y compris les *cocci*, les *coryneformes* et les bâtonnets à Gram négatif, constituaient

49% de la microflore du pollen floral, diminuaient à 28% dans le pollen corbiculaire et étaient rares (4%) dans le pain d'abeille (Gilliam, 1997).

La seule espèce de *Bacillus* associée au pollen floral était *B. subtilis*, qui augmentait en pollen corbiculaire et en pain d'abeille stocké dans les alvéoles pendant une semaine (Gilliam, 1991). En plus de *B. subtilis*, le pollen corbiculaire contenait *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* et des souches atypiques de *B. subtilis*, *Bacillus spp*, ce pollen comprenait seulement 2% des microorganismes dans le pollen floral, augmentait à 20% dans le pollen corbiculaire, puis restait à 11% dans le pain d'abeille (Gilliam, 1997).

La majorité des moisissures sont *Penicillium*, *Mucorales* et *Aspergillus*. Le pollen floral avait le plus grand nombre d'isolats de moisissures mais le moins d'espèces. Le pollen floral, le pollen corbiculaire et le pain d'abeille stockés différaient selon les moisissures prédominantes (Gilliam, 1989).

Le pollen floral avait également le plus grand nombre d'espèces de levures différentes qui diminuaient dans le pollen corbiculaire et le pain d'abeille. Les espèces prédominantes étaient *Cryptococcus albidus*, *Kloeckera apiculata* et *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii* dans le pollen floral ; *Cg.var. guilliermondii* et *T. magnoliae* dans le pollen corbiculaire; et *T. magnoliae* dans le pain d'abeille (Gilliam, 1979).

### 2.1.3. Le rôle des microorganismes du pollen

Les microorganismes du pollen et du pain d'abeille sont métaboliquement actifs et pourraient produire des composés tels que des enzymes, des vitamines, des substances antimicrobiennes, des acides organiques et des lipides qui contribuent à la conversion du pollen et à la stabilisation du pain d'abeille (Gilliam, 1979). Par exemple, les moisissures ont produit des enzymes impliquées dans le métabolisme des protéines, des lipides et des glucides (Gilliam et al., 1989).

De point de vu nutritif et appétitif, il semble que les levures aient un rôle très important, 80% des levures de pain d'abeille fermentent le glucose et le saccharose, toutefois, les levures sont mal définies tant vis-à-vis de leur contribution aux modifications biochimiques qu'elles apportent dans le pollen que de leur valeur alimentaire (Gilliam, 1966).

Les levures sont par ailleurs des sources de vitamines et d'enzymes. *Bacillus spp* du pollen et du pain d'abeille ont produit des enzymes protéolytiques, des substances anti microbiennes et des carbohydrates sont aussi exploités pour leur capacité à synthétiser et à sécréter d'énormes quantités d'enzymes et sont reconnus pour leur production d'antibiotiques et d'acides gras (Gilliam, 1979).

De plus, les *Aspergillus*, *Penicillium* et *Mucorales* sont utilisés industriellement pour la production d'antibiotiques, d'acides organiques, d'enzymes et de lipides. Les *Pseudomonas* sont des bactéries très répandus dans le règne végétal et certaines espèces sont connues comme possédant des métabolismes bien particuliers (Gilliam, 1966).

### 2.2. Altération du pollen d'abeille

#### 2.2.1. Définition

L'altération est une modification que subit un produit alimentaire par rapport à sa constitution spécifique, ce qui détermine sa valeur nutritionnelle et/ou le rend impropre à la consommation. Selon la composition de l'aliment et la nature des systèmes actifs des microorganismes dominants, on assistera à des altérations remarquables par les changements d'apparence, de texture, d'odeur et de saveur.

#### 2.2.2. Les facteurs influençant l'altération du pollen

Un contaminant se définit comme tout agent biologique ou chimique, toute matière étrangère, ou toute autre substance n'étant pas ajoutée intentionnellement au produit alimentaire et pouvant compromettre sa sécurité ou sa salubrité. Le pollen d'abeille peut être pollué par des contaminants chimiques, microbiologiques ou atmosphériques, par exemple par des métaux lourds et les pesticides (Bogdanov et al., 2004).

##### 2.2.2.1. Les contaminants biologiques et microbiologiques

Le pollen, avec sa richesse en nutriments, constitue un substrat très favorable au développement des organismes biologiques causant son altération. En premier lieu, l'humidité permet le développement des moisissures blanches ou vertes et des agents de fermentation. Ces ennemis rendent le pollen dangereux, donc inutilisable.

La présence des microorganismes dans le pollen peut influencer sur la qualité et la sécurité de ce complément alimentaire. Les microorganismes présents dans le pollen sont des bactéries, des moisissures et des levures ; ils proviennent des abeilles, du nectar ou des

sources externes : les humains, l'équipement, les contenants, les vents et la poussière sont des sources de contamination microbienne. L'intestin des abeilles mellifères contient 1% de levures, 27% de bactéries Gram positif (*Bacillus*, *Bacteridium*, *Streptococcus* et *Clostridium sp*) et 70% de bactéries Gram négatif (*Achoromobacter*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Pseudomonas*). Pour diverses raisons, la plupart des bactéries ne peuvent pas se développer ou se reproduire dans le pollen car il possède des propriétés antimicrobiennes (**waili, 2012**). Cependant, ce même auteur a rapporté que certains agents pathogènes peuvent se retrouver dans le pollen.

Les champignons et les bactéries attaquent le pollen pour ces teneurs en carbone et en azote dans la sporopollenine, ce qui corrode la surface de l'exine. Les bactéries anaérobies dégradent les ballonnets des grains de pollen des conifères (Plantes à ovules et graines nues). Les collemboles (petites arthropodes vivants dans les sols à l'abri de la lumière) altèrent le pollen en le consommant pour sa propre croissance (**Allmaraz, 2007**).

Les larves des fausses-teignes qui se développent dans le tiroir des trappes sont tuées par le séchage. Si les papillons peuvent venir pondre dans les lots de pollen insuffisamment sec, leurs larves évolueront en se nourrissant des pelotes.

Un acarien inconnu en Provence, le *Carpoglyphus lactis*, effrite les pelotes. Un insecte coléoptère, non spécifique, le *Sylvanus surrinamensis*, a été rencontré pour la première fois à Hyères, dans un petit lot de pollen où son évolution s'est poursuivie durant plusieurs mois (**Prost et le Conte, 2005**).

### 2.2.2.2. Les contaminants physiques

Les dangers physiques retenus sont les suivants : les cailloux ou poussières, métaux, objets coupants, fragments de verre, fragments de bois, fragments d'abeilles et de petits animaux, déjection de rongeurs, etc. (**Anses, 2012**).

### 2.2.2.3. Les contaminants chimiques

Les contaminants de l'environnement et ceux issus des pratiques apicoles constituent les dangers susceptibles de se retrouver dans les produits de la ruche. Ainsi, il convient de citer les contaminants issus des pratiques apicoles (traitements anti-varroas, antibiotiques contre les loques) qui constituent la source principale de la contamination des produits de la ruche.

### a. Métaux lourds

L'air et le sol contiennent des métaux lourds, principalement de l'industrie et de la circulation qui peut aussi contaminer la colonie d'abeille et ses produits. Le plomb (Pb) et le cadmium (Cd) sont considérés comme les principes toxiques des métaux lourds et sont donc les plus fréquemment étudiés. Le plomb contenu dans l'air provient principalement de la circulation automobile. En générale, le plomb n'est pas transporté par les plantes. D'autre part, le cadmium (Cd), provenant de l'industrie des métaux et des incinérateurs, est transporté du sol aux plantes (**Bogdanov, 2006**).

Il faut donc éviter de placer les ruches dans un environnement industriel pollué en métaux lourds. Des concentrations observées en plomb et en cadmium dans le pollen : 0.02-3.9 mg /kg et 0.03-2.1 mg/kg respectivement, qui doit de ce fait être récolté dans des zones moins exposées, à savoir dans un rayon de 3 km des sources de pollution (grands axes routiers, incinérateurs...250km) (**Bruneau, 2012**).

### b. Produits de traitement employés en apiculture

- Acaricides : Ce sont des traitements de lutte contre les épizooties des abeilles telles que les acariens qui parasitent les abeilles. Ce sont des pesticides chimiques, ils contiennent du benzène, des perméthrines, des aldéhydes, des phénols, des ammoniums ou d'autres composants toxiques pour l'environnement et pour la santé même à faible dose (**Sylvie, 2009**).
- Antibiotiques (utilisés pour la lutte contre les maladies bactériennes des abeilles- la loque américaine et la loque européenne) ;
- Résidus de produits de préservation du bois ;
- Produits utilisés dans la récolte du miel (rarement utilisés) ;
- Produits chimiques utilisés pour contrôler les autres parasites de l'abeille et les prédateurs (**Everlyn, 2014**).

### c. Pesticides

Les pesticides sont des substances chimiques destinées à éliminer les parasites animaux ou végétaux qui pourraient s'attaquer aux cultures. Ces agents chimiques peuvent tuer directement les abeilles (intoxication aigüe), mais ils peuvent aussi agir à des doses sublétales (intoxication chronique) (**Pettigrew, 2008**). Ils provoquent également des altérations morphologiques aux stades immatures, des troubles de butinage et de comportement, ainsi qu'une augmentation de la mortalité du couvain avec réduction de la

consommation de nourriture (**Yang et al., 2008**). Selon **Alaux et al. (2010)**, les pesticides peuvent constituer, par ailleurs, une source de stress et réduire la résistance aux pathogènes tels que *Nosema sp.* Une étude menée par **Mullin (2010)** dans les ruchers transhumants ou sédentaires en Amérique de Nord a mis en évidence 121 pesticides et leurs métabolites dans le pollen (30 fongicides, 17 herbicides, 16 pyréthrinoïdes parents, 13 organophosphorés, 4 carbamates, 4 néonicotinoïdes, 4 régulateurs de croissances des insectes, 3 cyclodiènes chlorés, 3 organochlorés, une formamidine, 8 acaricides/insecticides, 2 synergistes).

#### **d. Mycotoxines**

Les champignons colonisent avec succès l'environnement terrestre et utilisent efficacement les substrats solides. En se développant sur leurs matrices, beaucoup de champignons produisent des mycotoxines pouvant causer une intoxication aigüe ou chronique chez l'homme et les animaux après l'ingestion de denrées alimentaires et des aliments pour animaux contaminés (**Marasas et Nelson, 1987 ; Moss, 1996**).

Plusieurs mycéliums peuvent se développer dans le pollen : *Penicilium verrucosum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus prarasiticum* et *alternaria spp.* Ces espèces peuvent produire des toxines (ochratoxine A (OTA) et aflatoxine B1, B2...) (**Gonzalez et al., 2005**). Cependant, ce risque n'existe que si l'humidité du pollen est supérieure à 6% (**Nevas et al., 2002**).

#### **2.2.3. Les normes des contaminants dans le pollen**

La sécurité sanitaire des consommateurs, des contrôles permanents dans la chaîne apicole et la mise en œuvre de bonnes pratiques de production et de transformation par les apiculteurs sont essentielles. La commission internationale du miel (IHC) a proposé des critères de qualité pour le pollen d'abeilles (tableau III), rapportés par **Compos et al. (2008)**.

Tableau III : Normes des contaminants dans le pollen (IHC)

Analyses microbiologiques	
Salmonella	Absent/10g
Staphylococcus aureus	Absent/1g
Enterobacteriaceae	Max.100/g
Escherichia coli	Absent/g
Total aerobic plate count	<100 000 g
Mould and yeast	< 500 000 g
Organochlorine pesticides	< MRL
Organophosphate pesticides	< MRL
Pyrethroids	< MRL
Aflatoxin B1	Max.2µg/kg
Aflatoxin B1+B2+G1+G2	Max.4 µg/kg
Cloramphenicol (CAP)	Absent
Nitrofurantol metabolites	Absent
Sulfonamides	Absent
Heavy metal Pb	Max. 0,5 mg/kg
Heavy metal Hg	Max.0, 01 mg/kg
Heavy metal Cd	Max. 0,03 mg/kg
Radioactivity (Cs-134 and Cs-137)	<600 Bq/kg

MRL : Limite maximale applicable aux résidus

## 2.3. Récolte et conservation du pollen d'abeille

### 2.3.1. La récolte du pollen

#### 2.3.1.1. Par les abeilles

Ce sont les jeunes butineuses qui sont chargées de la récolte du pollen. Leur objectif est d'amasser le pollen en pelotes pour pouvoir le rapporter à la ruche. A cet effet, l'abeille utilise ses trois paires de pattes. De retour à la ruche, elle dépose le pollen dans des alvéoles. Le pollen est stocké au plus près du couvain car il entre prioritairement dans l'alimentation des larves. Il est pour l'abeille la nourriture de croissance, alors que le miel, issu du nectar, est sa nourriture à l'âge adulte. Le pollen stocké dans les alvéoles est susceptible de moisir à

l'humidité et afin d'éviter son altération, les abeilles le recouvrent du miel et produisent ainsi ce que l'on appelle le "pain des abeilles", qui associe pollen et miel (**Jaques et Claude, 2008**).

### 2.3.1.2. Par l'apiculteur

Le pollen est récolté par l'apiculteur "en saison croissante", c'est à dire lorsque la végétation regorge de plantes riches en pollen. La récolte doit tenir compte des besoins de la ruche car elle se fait au détriment du développement de la colonie. En général, on récolte environ 10% du pollen, dont les besoins moyens annuels d'une colonie sont estimés à environ 30 à 40 Kg. Pour ce faire, la récolte se fait à l'aide de trappes à pollen (Figure 3). Ces dernières sont placées à l'entrée de la ruche. La trappe est menée de peigne percé de trous à travers lequel les abeilles sont obligées de passer pour ramener le pollen dans la ruche, les pelotes de pollen dans les corbeilles de leurs pattes restent donc prisonnières et tombent dans un panier ou un bac situé sous la trappe (**Thibault, 2017**).

Avant de débiter la récolte, les trappes seront placées sur les ruches sans leur peigne pendant quelques jours afin que les abeilles s'habituent à cette nouvelle configuration. La récolte sera soit continue, soit temporaire. En cas de récolte continue, les apports vont diminuer après deux ou trois jours car les abeilles vont trouver le moyen de passer avec leurs pelotes (plus petites). En cas de récolte alternative, cet apprentissage sera ralenti et l'impact pourra être aussi important, ou même plus important, sur les ruches (perturbation plus forte) (**Bruneau, 2011**).

La récolte du pollen se fait préférentiellement en fin de journée lorsque l'activité est retombée et afin d'éviter l'utilisation de la fumée pour ne pas dénaturer le pollen. L'apiculteur récupère les pelotes tombées dans le filet ou le bac. Ce bac doit en permanence rester propre et conforme aux bonnes pratiques d'hygiène afin de ne pas contaminer la récolte suivante (**Thibault, 2017**). En effet, les restes de pollen dans le bac, sur lesquels se développent les moisissures, constituent la source de contamination des prochaines récoltes (**Bruneau, 2011**).



**Figure 3 : Trappe à pollen (Claude, 2009).**

### 2.3.2. Nettoyage

Une fois récolté, le pollen de chaque ruche est pesé. Ceci permet entre autre de comparer les ruches à meilleur rendement, et ainsi sélectionner les plus rentables pour augmenter la productivité. Le tri des pelotes est important puisqu'il s'agit d'éliminer toutes les impuretés présentes dans le mélange. Il se réalise en 3 étapes :

- a. La première consiste en un tri grossier à l'aide d'un tamis : éliminer les abeilles, larves mycoses, larves de fausse teigne, morceaux de plantes, poussières qui sont récupérés dans le tamis avec les grosses pelotes.
- b. Trieuse à pollen : Système de soufflerie qui consiste à séparer les éléments en fonction de leur poids. Les pelotes de pollen, grâce à leur poids tombent directement dans un bac situé sous l'entonnoir. Les éléments légers sont déviés et tombent dans un second bac. Les impuretés mélangées aux pelotes légères et à la poudre de pollen n'est évidemment pas jeté, il peut être récupéré pour rentrer dans la composition de l'alimentation à usage vétérinaire ou pour nourrir les abeilles.
- c. La dernière étape est un tri manuel à la pince à épiler dans un bac à fond clair pour éliminer ce qui est passé à travers les mailles du tamis. On retrouve en majorité des larves mycosées, des morceaux d'abeille. Parfois on y retrouve des pelotes de propolis qui sont laissées dans le mélange. C'est l'occasion de goûter les différentes pelotes de pollen pour en éliminer les plus amères lorsqu'il s'agit d'un pollen toutes fleurs (Thibault, 2017).

### 2.3.3. Techniques de conservation

Le pollen prélevé dans les trappes ne peut pas se conserver en l'état très longtemps, quelques jours à la température ambiante. Il est donc nécessaire d'appliquer au plus vite des traitements de stabilisation. Il existe en effet deux méthodes pour assurer sa conservation : la congélation et la déshydratation partielle (séchage) (**Gauthier, 2014**).

La qualité de tri, du séchage ou de la surgélation sont très importantes. Une attention particulière doit être portée à l'étape du conditionnement (mise en pot), concernant le choix du matériau pour le contenant (verre, plastique) et concernant le couvercle.

#### 2.3.3.1. Congélation

Le pollen frais, appelé aussi pollen cru est cent fois plus concentré en ferments lactobacilles que le pollen sec et beaucoup plus riche en vitamines. Le pollen frais contient 30 à 40 % d'eau (**Prost et le Conte, 2005**). La mise en congélation et/ou sous atmosphère contrôlée permet de stabiliser le pollen à l'état frais en lui conservant ses atouts nutritionnels et organoleptiques. De plus, sur le plan microbiologique, le pollen congelé à l'état frais conserve ses ferments vivants. Cette flore composée de microorganismes vivants favorables à la santé est préservée par la congélation mais ne survit généralement pas au séchage. Le pollen supporte la décongélation quelques heures et peut être ensuite recongelé sans risque car les pelotes ne renferment aucune flore bactérienne pathogène (**Gauthier, 2014**).

#### 2.3.3.2. Séchage

Les pelotes de pollen non séchées s'avarièrent et moisissent très rapidement. Afin d'éviter tout développement des levures et moisissures, il faut procéder au séchage à 42-45°C. Cette température est optimale pour sécher rapidement le pollen. On obtient une teneur en eau proche de 4%. Il est ensuite stocké dans un endroit sec à l'abri de l'air, de la lumière et de la chaleur pour limiter les risques d'insectes, d'acariens ou des processus d'oxydation (**Philippe, 2007**). Toutefois, le séchage est responsable partiellement d'une altération compositionnelle du pollen et donc de ses propriétés (**Melo et Almeida, 2016**). En effet, l'action anti-oxydante est l'une des propriétés les plus rapidement détruites lors de séchage, ainsi qu'une partie d'enzymes. Il est couramment considéré que le pollen perd environ 50% de sa valeur thérapeutique lors du séchage (**Cherbuliez, 2001**). Malgré ses inconvénients, cette méthode demeure la plus utilisée, principalement pour des raisons de faciliter la conservation et la manipulation (**Gauthier, 2014**).

#### **2.3.4. Modes de conditionnement du pollen**

Etant considéré comme un complément alimentaire, le pollen doit suivre de façon logique les recommandations en vigueur qui s'appliquent dans l'industrie alimentaire. Le pollen séché doit de ce fait être conservé dans un emballage qui le maintient à l'abri de l'humidité atmosphérique comme il en est pour les ressources alimentaires. En ce qui concerne le pollen congelé, il doit être frais et congelé rapidement pour préserver au maximum ses vertus nutritives. Il sera ensuite stocké au congélateur dans un emballage fermé. La chaîne du froid ne doit pas être interrompue (**Bruneau et Lequeux, 2009**).

Le conditionnement doit être réalisé dans le respect des bonnes pratiques de préparation et d'hygiène en Agro-alimentaire et il est recommandé de s'assurer avant tout conditionnement, que le pollen sec ne soit pas mélangé à des impuretés et tout autre élément étranger et, bien évidemment, qu'il ne soit pas rance (**Thibault, 2017**).



# **Partie experimentale**

### Partie expérimentale

#### I. Matériel et Méthodes

##### 1.1. Echantillonnage

L'étude a été réalisée sur deux types de pollens : le pollen sec stocké (PSS) pendant une année et le pollen sec frais (PSF) (non stocké). Trois échantillons pour chaque type de pollen ont été récupérés auprès des apiculteurs de la région de Tizi Ouzou. Les échantillons ont été séchés au moyen d'un séchoir à pollen à une température variant de 40 à 45°C. Ces échantillons sont ensuite conditionnés dans des bocaux en verre et entreposés à la température ambiante.

Sur les différents échantillons, nous avons effectué les analyses suivantes : mesure de la teneur en eau et le pH, ainsi que la recherche des flores et des germes suivants : La flore aérobie mésophile totale (FMAT), les coliformes totaux, les coliformes fécaux, les staphylocoques, les salmonelles et les levures et les moisissures.

Les analyses ont été effectués au sein de laboratoire de microbiologie du département Agronomie et au laboratoire de physicochimie du département biologie.

Notre étude s'intéresse à une comparaison entre les caractéristiques microbiologiques d'un pollen sec stocké pendant une année et d'un pollen sec frais de la saison dans le but d'évaluer l'effet du temps sur la stabilité de la qualité microbiologique du pollen.

##### 1.2. Analyses physicochimiques

###### 1.2.1. La teneur en eau

- **Mode opératoire**

La détermination de taux d'humidité des échantillons du pollen consiste à peser 1 g d'échantillon dans des creusets et les placer dans une étuve à 105 C° pendant 48 heures. Les échantillons sont pesés après refroidissement dans un dessiccateur, remettre une heure à l'étuve et procéder à une nouvelle pesée. Refaire l'opération jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage :  $(p\%) = [(p_0 - p_1) / p] \times 100$  (Nabas et *al.*, 2014).

Sachant que :

- $p_0$  : poids de l'échantillon et du creuset avant séchage

- $p_1$  : poids de l'échantillon et du creuset après séchage

- $p$  : masse de la prise d'essai (g).

### 1.2.2. Le pH

Cette mesure est réalisée à l'aide d'un pH-mètre qui mesure la différence du potentiel entre les deux électrodes qui sont émergées dans l'échantillon.

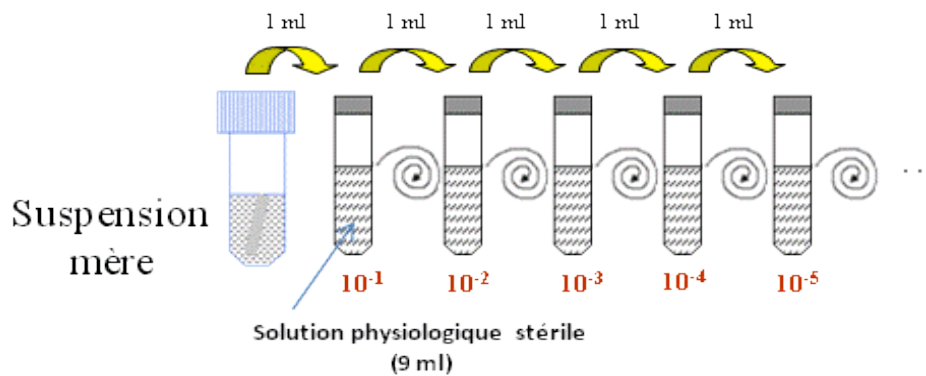
- **Mode opératoire**

- Peser un 1 g de l'échantillon de pollen préalablement broyé à l'aide d'un mortier en verre ;
- Porter l'échantillon dans un bécher de 200 ml contenant 100ml de l'eau distillée ;
- Agiter la suspension pendant quelques minutes grâce à un agitateur ;
- Laisser la suspension en repos pendant 15 mn et agiter de nouveau pour quelques instants ;
- Le pH- mètre doit être étalonné avant son utilisation à l'aide des solutions tampons ;
- Plonger la pointe de l'électrode dans le liquide et la valeur du pH s'affiche au potentiomètre ;
- Noter le pH de la suspension après stabilisation de l'appareil.

### 1.3. Analyses microbiologiques

#### 1.3.1. Préparation de la suspension mère (SM)

- Près du bec benzène, introduire aseptiquement 25g du produit à analyser (pollen sec) dans un flacon stérile contenant au préalable 225 ml de diluant (eau physiologique stérile). Cette suspension constitue alors la solution mère (**Guiraud, 2003**).
- La suspension mère est diluée successivement dans une solution physiologique stérile (Eau physiologique).
- La dilution décimale en cascade est effectuée en transférant une prise d'essai de 1 ml de suspension à diluer dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile
- Le nombre de dilutions nécessaires est choisi en fonction de la concentration attendue en microorganismes dans la suspension.



**Figure 3 : Dilution en série de l'échantillon dans une solution physiologique (INRS, 2019).**

### 1.3.2. Recherche et dénombrement des germes

#### 1.3.2.1. Flore mésophile aérobie totale (FMAT)

Leur dénombrement repose sur l'emploi d'une gélose PCA sélective.

- **Mode opératoire**

- On prend une pipette stérile et à partir de la dernière dilution ( $D 10^{-5}$ ), on prélève 1 ml qu'on répartira en gouttes au fond de la boîte correspondante, et renouveler l'opération pour la seconde boîte ;
- Sans changer de pipette on remonte à la dilution supérieure, et on recommence et ce ainsi de suite jusqu'à la première dilution ;
- On recouvre les gouttes d'une couche de gélose PCA en surfusion ;
- Homogénéisées par des mouvements circulaires ;
- On laisse solidifier puis on incube à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 72 heures avec une lecture toutes les 24 heures ;
- Les colonies de germes mésophiles aérobies se présentent sous forme lenticulaires en masse et blanchâtres ; le dénombrement s'effectue sur les boîtes contenant des colonies dont le nombre est compris entre 30 et 300.

#### 1.3.2.2. Coliformes totaux et fécaux

Leur détermination se fait par la technique en double couche sur la gélose VRBL.

- **Mode opératoire**

- Préparer les boîtes de pétrie stériles ;

- A partir des dilutions décimales réalisées, porter aseptiquement 1 ml dans deux boîtes de pétri vides ;
- Ajouter la gélose VRBL ;
- Homogénéiser avec des mouvements circulaires ;
- Après la solidification, recouvrir la surface avec une deuxième couche mince du même milieu et laisser gélifier à température ambiante ;
- L'incubation a lieu pendant 24 heures à 48 heures, à 30°C pour les coliformes « totaux » et à 44°C pour les coliformes « fécaux » ;
- Les colonies caractéristiques sont de couleur rouge ayant un diamètre de 0,5 mm

### 1.3.2.3. La flore lactique

La recherche de la flore lactique se fait par un ensemencement en surface sur la gélose MR

- **Mode opératoire**

- On Préparer les boîtes de pétrie stériles, Coulées par la gélose MRS ;
- On étale 0,1 ml (prélevé à partir de la suspension mère et des dilutions décimales) à l'aide d'un râteau sur la totalité des boîtes de pétrie sur MRS solidifié ;
- L'incubation se fait à 37° C pendant 72h. Les colonies développées présentent une coloration blanche crémeuse arrondie.

### 1.3.2.4. *Staphylococcus aureus*

Elles sont ensemencées en surface sur la gélose de Baird Parker additionnée au jaune d'œuf et au tellurite de potassium.

- **Mode opératoire**

- On dépose 0,1 ml de la suspension à analyser (suspension mère et/ou l'une des dilutions) sur le milieu de culture (Baird Parker) préalablement coulé et solidifié ;
- On étale de façon uniforme à l'aide d'un étaleur stérile jusqu'à ce qu'il ne reste plus de liquide visible à la surface du milieu ;
- L'incubation se fait à 37°C pendant 48h à ;
- Seules les colonies entourées d'un halo jaune brillant à centre noire sont dénombrées.

### 1.3.2.5. *Salmonella*

- **Mode opératoire**

- Peser aseptiquement 25g de l'échantillon dans un erlenmeyer à l'aide d'une balance de précision et ajouter 225ml du milieu de pré-enrichissement (eau physiologique) ;
- Après homogénéisation, incuber à 37°C/16 à 20h (la revivification) ;
- Après incubation, transférer 10 ml de la solution pré-enrichie dans un tube à essai et dessus ajouter 1ml de Rappaport Vassiliadis puis incuber à 37°C/24h ;
- On réalise un isolement sur la gélose Hektoen pour chercher et dénombrer les salmonelles.
- Les salmonelles se présentent souvent sous forme de colonies gris bleu à centre noir sur la gélose Hektoen.

### 1.3.2.6. Levures et moisissures

La recherche des levures et des moisissures se fait sur la gélose OGA par un ensemencement en surface.

- **Mode opératoire**

- On dépose 0,1 ml de la suspension à analyser (suspension mère et/ou l'une des dilutions) sur le milieu de culture OGA préalablement coulé et solidifié ;
- On étale de façon uniforme à l'aide d'un râteau stérile jusqu'à ce qu'il ne reste plus de liquide visible à la surface du milieu ;
- Chaque dilution est étalée sur deux boîtes de milieu pour trois dilutions successives ;
- L'incubation se fait à 25° C pendant 3 à 5 jours ;
- La lecture s'effectue sur les boîtes dans lesquelles le nombre des colonies compris entre 15 et 300, on distingue les levures des moisissures par leur forme et leur couleur.

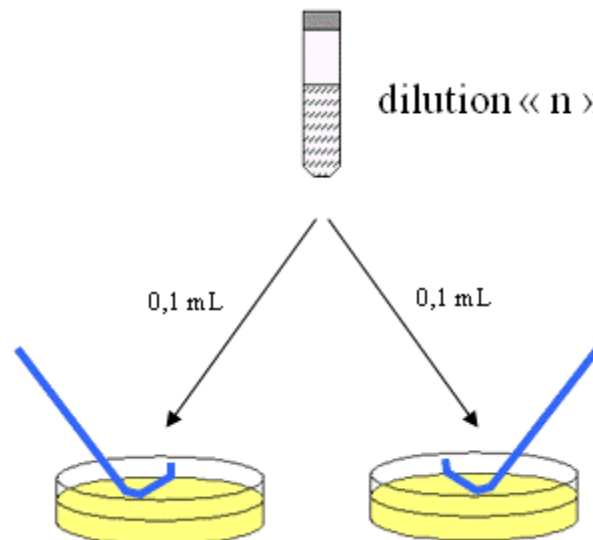


Figure 4 : Etalement de la suspension diluée sur les milieux de culture (INRS, 2019)

#### 1.4. Observation microscopique de quelques moisissures

La détermination des moisissures fait appel aux caractères morphologiques des hyphes et de structure de reproduction.

- Les hyphes : couleur, présence ou non de cloisons, diamètre approximatif, structure particulière.
- Structure et disposition des spores : couleur, forme, nombre, cloisons, taille.

- **Mode opératoire**

- On dépose une goutte de réactif (Blue de méthylène) ou d'eau sur une lame.
- On dépose l'échantillon dans la goutte à l'aide de la pincette ou d'aiguille.
- On couvre avec une lamelle, en plaçant un coté de celle-ci sur la lame en la laissant basculée sur la goutte contenant l'échantillon, cela permet de chasser un maximum d'air.
- Si nécessaire, on peut tapoter la lamelle pour écraser les tissus, si du liquide passe sous la lamelle on absorbera avec un mouchoir en papier.
- On procède à l'observation sous le microscope.

#### 1.5. Analyse statistique

L'interprétation des résultats obtenus pour les analyses physico-chimiques et microbiologiques est basée sur une analyse de variance (ANOVA) à un facteur par

l'utilisation d'un logiciel STATBOX version 6.2. Cette analyse statistique consiste en une comparaison des moyennes des différents paramètres étudiés des deux types du pollen d'abeille.

## II. Résultats et discussion

### 2.1. Résultats des analyses physicochimiques

#### 2.1.1. La teneur en eau

La teneur en eau (exprime la teneur totale : l'eau libre et liée) et l'activité de l'eau (mesure la quantité d'eau libre) jouent un rôle important dans les caractéristiques organoleptiques et la durée de conservation du pollen d'abeille. Lorsque ces valeurs sont très élevées, elles peuvent favoriser potentiellement la contamination microbienne, principalement par des moisissures et des levures (**Morgano et al., 2011**).

Les résultats de la teneur en eau de pollen sec stocké (PSS) et de pollen sec frais (PSF) sont présentés dans le tableau IV.

**Tableau IV : Résultats de la teneur en eau en pourcentage (%) des deux types du pollen d'abeille**

Echantillons	PSS	PSF
E1	12,54	6,7
E2	10,47	4,7
E3	16,22	8,9
Moyennes ± Ecart type	13,07 ± 2,37	6,76±1,71

Le tableau IV illustre les teneurs en eau des échantillons du pollen sec stocké qui varient en moyenne de 10,47% et 16,22%, cependant celles des échantillons du pollen sec frais oscillent entre 4,7% et 8,9%. L'analyse statistique des résultats de la teneur en eau révèle l'existence d'une différence significative entre la moyenne des échantillons du pollen sec stocké et la moyenne des échantillons du pollen sec frais ( $p = 0.02$ ).

Les valeurs des échantillons du pollen sec frais présentent une moyenne de 6,76% qui est conforme aux recommandations des normes d'Argentine qui stipule une teneur maximale de 8%. Plus ces valeurs en eau sont faibles, plus longue sera sa durée de conservation. En effet, une faible teneur en eau ne favorise pas le développement des microorganismes à condition de maintenir le pollen dans un emballage imperméable à la vapeur d'eau. Contrairement aux échantillons du pollen sec stocké qui révèlent des teneurs importantes avec une moyenne de 13,07% qui dépasse la norme recommandée par l'Argentine (8%). Le pollen riche en eau sera plus facilement agressé par des microorganismes tels que bactéries et champignons (**Thibault, 2017**).

Cette humidité élevée pourrait être expliquée par la réhydratation du pollen si une longue période s'écoule entre le séchage et la mise en pot. Selon **Stanely et Linskens (1974)**, il est important de maintenir la plus basse teneur en eau possible tout au long de la conservation du pollen pour limiter la dégradation enzymatique des substrats endogènes (ex : sucres simples), assurer la viabilité des grains du pollen et ralentir le développement microbien.

Il a été recommandé que l'activité de l'eau doive être inférieure à 0,30 pour la bonne stabilité au stockage des aliments déshydratés comme le pollen (**Bonvehì et Jordá, 1997**).

D'après **Duffield (1954)**, le maintien d'une faible teneur en eau ne veut pas dire que la conservation doit se faire dans une atmosphère totalement sèche. Les résultats obtenus sur la conservation de sept espèces de pin après environ un an, les meilleures conditions de conservation sont observées à une humidité de l'air comprise entre 10 à 25% et à une température située entre 0 et 5°C.

L'humidité maximale du pollen autorisée varie d'un pays à l'autre : Brésil 4%, Suisse 6%, en Russie 8-10%, Bulgarie 10%. Plus de 10% rend le pollen susceptible à la fermentation. L'examen de la qualité sensorielle en suisse a permis de conclure que le taux d'humidité de moins de 6% rend le pollen trop sec et moins acceptable de point de vue sensoriel.

### 2.1.2. Le pH

Le pH (ou potentiel d'hydrogène) est défini comme cologarithme de la concentration en ions H<sup>+</sup> dans une solution. C'est l'un des facteurs qui va contribuer à renforcer ou à ralentir la dégradation naturelle du pollen car il influence sur sa texture et sa stabilité pendant le stockage.

**Tableau V : Résultats des valeurs du pH des deux types du pollen d'abeille**

Echantillons	PSS	PSF
E1	5,2	5,1
E2	5,4	6,8
E3	4,9	5,7
Moyennes ± Ecart type	5,16±0,20	5,86±0,70

Le pollen, avec sa composition biochimique (protéines et sucres), peut constituer un milieu favorable au développement des microorganismes, si les autres conditions du milieu sont favorables (pH, humidité, oxygène...etc.). Le tableau V illustre les valeurs du pH des

échantillons du pollen sec stocké qui varient entre 4,9 et 5,4, et entre 5,1 et 6,8 pour les échantillons du pollen sec frais. Cette variation entre échantillons peut être due à leurs origines botaniques, les conditions environnementales et les conditions de stockage. Les résultats du pH du pollen sec stocké sont proches de ceux enregistrés par **Gergen et al. (2006)** et **Feas et al. (2012)** et dont les valeurs oscillent de 4,3 à 5,2. Les valeurs moyennes enregistrées sont de 5,16 et 5,86 respectivement pour le pollen sec stocké et le pollen sec frais. Donc les deux types de pollen sont conformes à la norme fixée par la législation brésilienne pour le pH qui varie de 4 à 6. Toutefois, l'analyse statistique a révélé des différences non significatives ( $p=0,25$ ). Les valeurs relativement faibles enregistrées dans le pollen sec stocké peuvent s'expliquer par la fermentation des sucres par les micro-organismes survivants dans le pollen sec, particulièrement les levures.

Les valeurs basses du pH pourraient être dues à une fermentation par les levures et moisissures (on peut estimer qu'une partie de ces dernières ont pu survivre après le séchage. La fermentation est favorisée par l'humidité (l'activité de l'eau) ainsi que la température et comme résultat de cette fermentation il y a l'acide lactique qui fait baisser le pH du milieu (**Jeantet et al., 2006**). L'acidification du pollen est une technique de conservation efficace qui permet de réduire de façon considérable sa charge bactérienne (**Cherbulliez, 2001**).

### 2.2. Résultats des analyses microbiologiques

Le pollen est un milieu biologiquement très actif, il est exposé à des diverses contaminations microbiennes. Les critères généraux de qualité et de la sécurité des pollens d'abeille ont été proposés par la commission internationale du miel (IHC) et rapportés par **campos et al. (2008)**.

Certains chercheurs comme **Shvetsova et al. (2014)** ont rapporté une grande étendue de résultats sur la contamination microbienne de pollen d'abeille avec des bactéries de la famille entérobactéries, et il est reconnu que certaines espèces de cette famille sont pathogènes.

#### 2.2.1. La flore mésophile aérobie totale : FMAT

Est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité formant une colonie). Ce sont des microorganismes qui se développent dans un produit ou à l'air ambiant avec une croissance optimale à 30°C.

**Gilliam et al. (1983)** ont signalé la présence de bacilles à Gram- et à Gram+, ainsi que de cocci à Gram + dans le nectar. En outre, les champignons trouvés en association avec les colonies d'abeilles domestiques ou ils persistent sur le nectar, le pollen, les débris de colonie et à l'intérieur des abeilles elles même (**Benoit et al., 2004**). Il semble que les abeilles soient la principale source de contamination du pollen.

**Tableau VI : Résultats de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (UFC/g) des deux types du pollen d'abeille**

Echantillons	PSS	PSF
E1	2470000	34200
E2	2366000	26100
E3	2785000	24300
Moyennes± Ecart type	2540333±178139,15	28200±4305,81

Le nombre de germes mésophiles totaux des échantillons du pollen étudiés illustré dans le tableau VI varie en moyenne entre 2 366000 UFC/g et 2 785000 UFC/g pour le pollen sec stocké (2018) et entre 24300 UFC/g et 34200 UFC/g pour le pollen sec frais (2019). La charge microbienne moyenne de la FMAT est de 2 540 333 UFC /g dans le pollen sec stocké et de 28 200 UFC/g dans le pollen sec frais. L'analyse statistique révèle l'existence d'une différence très hautement significative entre les deux types de pollen ( $p=0,001$ ).

La charge élevée de la FMAT enregistrée dans le pollen sec stocké (PSS), comparativement à la charge de cette flore dans le pollen sec frais (PSF), confirme ainsi que la durée de stockage est un facteur d'altération si les conditions de stockage ne sont pas respectées (température, humidité, type d'emballage).

La charge de la FMAT dans le PSS dépasse la norme établie par le code alimentaire Argentin, qui fixe une valeur maximale de  $1,5 \cdot 10^5$  UFC/g de la flore mésophile totale ainsi que la norme fixée par la commission internationale du miel (IHC) qui est  $10^5$  UFC/g. La charge de la FMAT reflète la qualité hygiénique des denrées alimentaires ou de matières premières, ainsi que les la transformation, la manipulation et les conditions de stockage. La présence d'un grand nombre de bactéries mésophiles dans le pollen déshydraté peut indiquer des matières premières excessivement contaminées c.à.d. la charge initiale du pollen est très élevée, les impuretés qui peuvent tomber dans le tiroir à pollen lors de nettoyage habituel de la ruche (cadavres d'abeilles, la cire, larves momifiées à cause de certaines maladies qui

peuvent toucher la ruche), nettoyage et désinfection inadéquate des surfaces, hygiène insuffisante, conditions de température/temps inadéquate dans la production ou la conservation, ou une combinaison de ces circonstances (Melo et al., 2016 ; Estevinho et al., 2012 ; Feas et al., 2011 ; Franco et Landgraf, 2005 ; Belhadj et al., 2012 ; Nogueira et al., 2012).

Par contre, le pollen sec frais (PSF) avec une charge moyenne de 28 200 UFC/g est conforme à la norme établie par le code alimentaire Argentin ainsi que la norme IHC. Par ailleurs, ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Adjlane et al. (2017) dans le pollen de la région de Tizi Ouzou ( $150.10^3$ UFC/g). Cette charge initiale relativement faible peut évoluer au cours du stockage si les conditions d'entreposage ne seront pas respectées.

### 2.2.2. Coliformes totaux

Les coliformes sont des entérobactéries GRAM-, anaérobies facultatifs, regroupent les souches d'origine intestinale et celle de l'environnement. Les coliformes fécaux sont témoins d'une contamination fécale récente.

Les coliformes totaux sont des indicateurs de contamination au cours de la production, ainsi que la collecte et la transformation des aliments (Belhadj et al., 2012). Mais il s'agit également d'un groupe diversifié de microorganismes présents dans l'environnement naturel (Martin et al., 2016). Les principaux genres bactériens inclus dans le groupe sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Serratia* (Santé canada, 2012).

Il existe deux hypothèses sur la présence de microorganismes viables dans les échantillons de pollen d'abeilles déshydraté : la basse température utilisée dans le processus de déshydratation est insuffisante pour éliminer les microorganismes et/ou la contamination de pollen se produit pendant les étapes de traitement après la déshydratation (Barreto et al., 2005).

**Tableau VII : Résultats de dénombrement des coliformes totaux (UFC/g) des deux types du pollen d'abeille**

Echantillons	PSS	PSF
E1	146	90
E2	121	203
E3	206	34
Moyennes ± Ecart type	157,66±35,67	109±70,29

Le nombre de coliformes totaux des échantillons de pollen étudiés illustré dans le tableau VII varie en moyenne entre 121 UFC/g et 206 UFC/g pour le pollen sec stocké (2018) et entre 34 UFC/g et 203 UFC/g pour le pollen sec frais (2019). Les valeurs moyennes des coliformes totaux obtenues dans le pollen sec stocké est de 157,66 UFC/g et dans le pollen sec de la saison est de 109 UFC/g, dépassant de loin les valeurs fixées par la norme enregistrée par IHC qui est 100 UFC/g. Par contre ces valeurs sont inférieures à celles obtenues par **Adjlane et al. (2017)** :  $65.10^3$ UFC/g et par **De-Melo et al. (2015)** :  $280.10^3$ UFC/g.

Les résultats élevés enregistrés dans notre étude peuvent s'expliquer par le non-respect des conditions d'hygiène lors de la collecte, du nettoyage, du séchage et du conditionnement. Mais aussi la température relativement basse utilisée pour sécher cet aliment. Cette charge élevée en coliformes peut aussi compromettre sa conservation mais sa sécurité sanitaire exigée par la réglementation et réclamée par le consommateur.

Par ailleurs, l'analyse statistique n'a pas révélé de différences significatives ( $p = 0,57$ ) entre les deux types de pollen. Ce dernier résultat peut s'expliquer par une relative stabilité de cette flore lors du stockage. Cette relative stabilité au cours de la conservation est due au faible taux d'humidité et de l'AW.

### 2.2.3. Coliformes fécaux

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermo tolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5°C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien et l'*Escherichia coli* (*E.coli*) et, dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klesiella* (**Elmud et al., 1999 ; Santé Canada, 1991 ; Edberg et al., 2000**). Bien que la présence de coliformes fécaux témoigne habituellement d'une contamination d'origine fécale, Plusieurs coliformes fécaux ne sont pas d'origine fécale, provenant plutôt d'eaux enrichies en matière organique, tels les effluents industriels du secteur des pâtes et papiers ou de la transformation alimentaire (**Barthe et al., 1998 ; OMS, 2000**). Ils sont responsables de plusieurs symptômes : La diarrhée aigüe, inflammation, colite hémorragique, les infections des voies urinaires, la septicémie et la méningite néonatale (**Kaper et al., 2004**).

**Tableau VIII : Résultats de la recherche des coliformes fécaux (UFC/g) des deux types du pollen d'abeille**

Echantillons	PSS	PSF
E1	Absence	Absence
E2	Absence	Absence
E3	Absence	Absence

Ces bactéries sont également considérées comme des indicateurs de l'insalubrité de la production alimentaire, ils sont la meilleure indication de la présence d'agents pathogènes d'origine entérique tels qu'*Escherichia coli*. D'après les résultats mentionnés dans le tableau VIII, on constate l'absence totale des coliformes fécaux dans le PSS et le PSF, donc ces deux types de pollen sont conformes à la norme IHC (0UFC/g). Ces microorganismes sont peut-être inhibés par l'acidité du pollen ou alors à l'action bactériostatique de ce dernier (**Cherbuliez, 2001**). Cet effet bactériostatique est attribué à l'addition du glucose oxydase par l'abeille quand elle mélange le nectar aux grains de pollen au moment de la confection des pelotes (**Dustmann et Gunst, 1986**).

#### 2.2.4. La flore lactique

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, anaérobies partiellement tolérantes à l'oxygène, ne produisant pas en général de spores, se présentant sous forme de coques ou de bâtonnets et capables de fermenter les sucres en acide lactique.

Elles ont pour habitat de nombreux milieux naturels (sol, plantes en décomposition, les animaux, etc.) et accompagnant l'activité humaine en tant que bactéries de la flore commensale des muqueuses et de la flore alimentaire.

IL s'agit essentiellement des lactobacilles (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*) et les bifidobactéries provenant directement du jabot des abeilles lors du butinage du pollen. Les bactéries lactiques dégradent partiellement la membrane protectrice du pollen pour une assimilation complète par l'organisme et une protection contre les microorganismes pathogènes grâce à l'acidification provoquée par la lactofermentation.

**Tableau IX : Résultats de dénombrement des bactéries lactiques (UFC/g) des deux types du pollen d'abeille**

Echantillons	PSS	PSF
E1	0	0
E2	0	0
E3	0	0
Moyennes ± Ecart type	0	0

Au vu des résultats obtenus et représentés dans le tableau IX, on remarque une absence totale de la flore lactique. Selon **Pain et Maugenet (1966)** la disparition des bactéries lactiques et de certaines levures pourraient être dû à l'effet de la grande quantité d'acide lactique produite, ce qui induit à l'abaissement du pH du pollen de trappe. En fonction d'une baisse de la température et d'une humidité accrue, peut intervenir, après cette phase, un développement de moisissures (*Pericyctis alvei*) qui consomme l'acide lactique. **Gilliam et al. (1989)** ajoutent que la fermentation microbienne, permet à certaines espèces de survivre et d'autre pas. Ces espèces qui ont pu survivre seront éliminées après le séchage du pollen

### 2.2.6. La flore pathogène

- **Les Staphylocoques**

Sont des coques Gram positif arrondies, ils apparaissent le plus souvent en amas régulier. Les staphylocoques poussent aisément sur les milieux usuels, donnant sur gélose des colonies rondes, lisses, blanches ou dorées. Elles produisent une enterotoxine thermostable, en cas d'ingestion provoque une intoxication alimentaire (**Franco et Landgraf, 2009**).

- **Les salmonelles**

Appartenant à la famille des entérobactéries. Elles provoquent chez l'espèce humaine des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la salmonellose, c'est l'une des principales causes de toxi-infection alimentaire collective (TIAC).

**Tableau X : Résultats de la recherche des staphylocoques et des salmonelles (UFC/g) des deux types du pollen d’abeille**

Echantillons	Staphylocoques		Salmonelles	
	PSS	PSF	PSS	PSF
E1	Absence	Absence	Absence	Absence
E2	Absence	Absence	Absence	Absence
E3	Absence	Absence	Absence	Absence

Au vu des résultats obtenus et représentés dans le tableau X, on remarque une absence totale des germes pathogènes à incidence sanitaire (*salmonella* et *staphylococcus*) dans le pollen étudié. Ceci serait probablement dû aux propriétés antibactériennes du pollen. Nos résultats sont conformes aux normes de la Commission internationale du miel (IHC) qui stipulent que les pollens devraient présenter les aspects microbiens suivants : absence des salmonelles /10g ; absence de *Staphylococcus* et d’*Escherichia coli*/1g.

Selon les résultats obtenus par **Fatrocová et al. (2013)**, l’activité antibactérienne la plus élevée du pollen de pavot a été mise en évidence contre *Staphylococcus aureus*, une bactérie à GRAM+, dans 70% d’extrait éthanolique au bout de 24 heures. La sensibilité élevée des extraits de pollen d’abeille de colza a été trouvée dans un extrait éthanolique à 70% contre *Salmonella enterica* après 48 heures. De plus, les bactéries à GRAM+ sont plus sensibles au pollen d’abeilles que les bactéries à GRAM-. Nous pouvons confirmer que le pollen d’abeille possède des propriétés biologiques intéressantes et pourrait être considéré comme un aliment fonctionnel.

### 2.2.7. Levures et moisissures

Les levures et les moisissures, plus généralement appelées « champignons » ou « mycètes » sont présentes, tout comme les bactéries, un peu partout (surface, sol, air, etc.). Alors que certaines d’entre-elles sont considérées comme « utiles » et servant, par exemple, à l’affinage de nombreux fromages, d’autres peuvent provoquer des fermentations gazeuses avec des goûts indésirables et des intoxications alimentaires. En outre, la présence de levures et des moisissures dans des aliments accélère leur détérioration. Ces derniers deviennent alors très rapidement invendables.

**Tableau XI : Résultats de dénombrement des levures et moisissures (UFC/g) des deux types du pollen d'abeille**

Echantillons	PSS	PSF
E1	2571.4	3272.7
E2	2809.5	2666.6
E3	4363.6	2333.3
Moyennes± Ecart type	3248,16±794,69	2757,53±388,66

Les levures et moisissures ont été dénombrées dans tous les échantillons analysés, les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau XI. Le nombre varie de 2571,4 UFC/g à 4363,6 UFC/g dans les échantillons de PSS (2018) et entre 2333,3 UFC/g et 3272,7 UFC/g dans les échantillons de PSF (2019). Selon l'article 785 du code alimentaire Argentin (**Argentine, 1990**), la charge des levures et moisissures dans les deux types du pollen analysés (PSS et PSF) sont conformes à la norme établie qui est de l'ordre de  $10^4$  UFC/g. Nos résultats sont par ailleurs inférieurs à ceux obtenus par IHC (**2008**) et **Coronel et al. (2004)** qui ont obtenu des charges en levures et moisissures inférieures ou égales à 50000UFC/g et à 10000 UFC/g respectivement.

La charge moyenne en levures et moisissures des deux types de pollen est 3248,16 UFC/g et de 2757,53UFC/g respectivement dans le PSS et le PSF. Nous constatons une charge plus élevée dans le PSS par rapport au PSF qui peut être due à la durée et aux conditions de stockage. Cependant l'analyse statistique des moyennes des levures et moisissures révèle l'existence d'une différence non significative entre les deux types de pollen ( $p=0,6$ ).

**Coronel et al. (2004)** ont trouvé un nombre de levures et moisissures supérieure à  $10^4$  UFC/g dans des échantillons de pollen étudiés et une vingtaine d'espèces sont identifiées, parmi lesquelles figurent des espèces toxigènes telles que : *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium funiculosum* et *Aspergillus alternata*.

A l'intérieure de l'anthere le pollen est stérile, donc sa contamination microbienne peut être attribué à des matières végétales, l'environnement, les insectes (par exemple, les abeilles domestiques), les humains et leurs engins agricoles (**Belhadj et al., 2012**). La présence des levures dans le pollen pourrait être aussi le résultat de leur addition par l'abeille lors de la confection des pelotes, et dont la durée et la température de séchage ne sont pas

efficaces pour leur élimination, et d'après **Layral et Verling (2001)**, les levures tolèrent selon les espèces des températures de 35 à 47 °C.

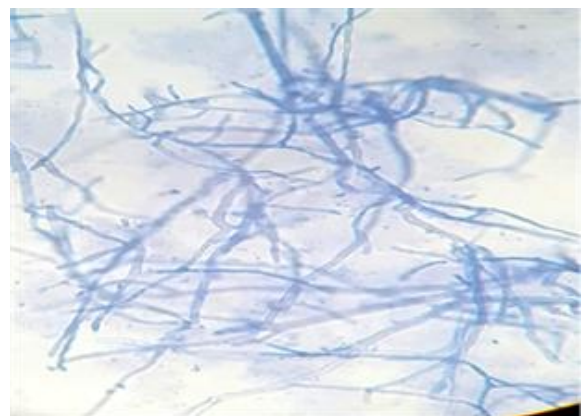
Cependant, le pollen n'est pas antifongique, il peut être attaqué par les moisissures quand il est exposé à l'humidité (**Libis, 1971**), ce qui explique leur grande présence dans les échantillons de pollen étudiés en particulier le pollen sec stocké (2018), ainsi que les conditions du milieu dont la température (les échantillons sont laissés à la température ordinaire) et le pH (avec une moyenne de 5,16 pour le PSS et 5,86 pour le PSF) qui sont favorables pour leur croissance. Selon **Bourgeois et al. (1988)**, les moisissures tolèrent des températures de 15 à 30 °C et un pH de 4 à 8.

### 2.3. Résultats d'observation microscopique

Considérant que la consommation du pollen d'abeille pourrait être un risque potentiel pour la santé humaine s'il est contaminé par des champignons dont la plupart sont mycotoxigéniques, productrices de toxines : ochratoxine A (OTA), aflatoxine B1 aflatoxine B2 (**Bruneau, 2012 ; Petrović et al., 2014**) dont on a procédé à une observation microscopique pour identifier quelques genres de champignons.



**Figure 6 : Image microscopique d'un mycélium du genre *Rhizopus spp* prélevé de l'échantillon du PSF de la dilution  $10^{-2}$**

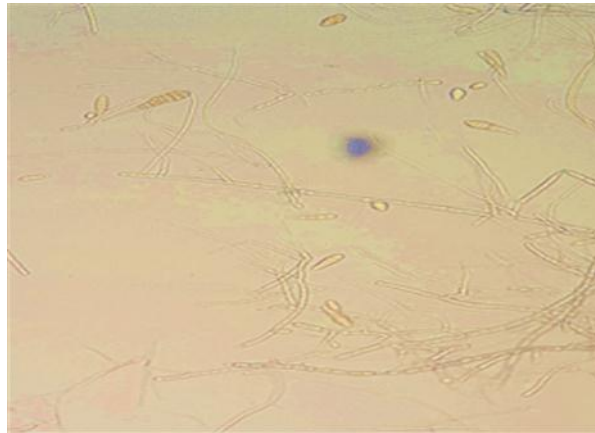


**Figure 7 : Image microscopique d'un mycélium du genre *Rhizopus spp* prélevé de l'échantillon du PSS de la dilution  $10^{-3}$**

Les figures 6 et 7 révèlent que le mycélium observé caractérise le genre *Rhizopus spp*. Les *Rhizopus* sont des champignons inférieurs de l'ordre des Mucorales sont surtout des saprophytes sur une grande variété des substrats. Les espèces du genre *Rhizopus* contaminant

fréquemment les denrées alimentaires ainsi que les aliments pour animaux, ils font partie des champignons les plus communs qui se développent dans les grains humides

Les deux espèces extrêmement toxiques sont *Rhizopus microsporus* qui est un producteur de Rhizonin A et le *Rhizopus chinensis*. (Rabie et al., 1985).



**Figure 8 : Image microscopique d'un mycélium du genre *Alternaria spp* prélevé de l'échantillon du PSF de la dilution  $10^{-3}$**

La figure 8 montre une observation microscopique d'un mycélium qui appartient au genre *Alternaria spp*. Les espèces appartenant au genre *Alternaria* sont des mycètes cosmopolites fréquemment isolés d'échantillon de plantes, de terre, de nourriture et d'air intérieur. Certaines espèces d'Alternerai sont reconnues en tant que phytopathogènes importants (Patterson et Mcginnins, 1987). Les espèces *Alternerai* peuvent produire dans des conditions appropriées des toxines telles que l'Alternariol l'éther monométhylque, l'acide tenuazonique et le zinniol (Moss, 1996).



**Figure 9 : Image microscopique d'un mycélium du genre *Aspergillus spp* prélevé de l'échantillon du PSF de la dilution  $10^{-2}$**

La figure 9 montre une observation microscopique d'un mycélium caractéristique du genre *Aspergillus spp*.

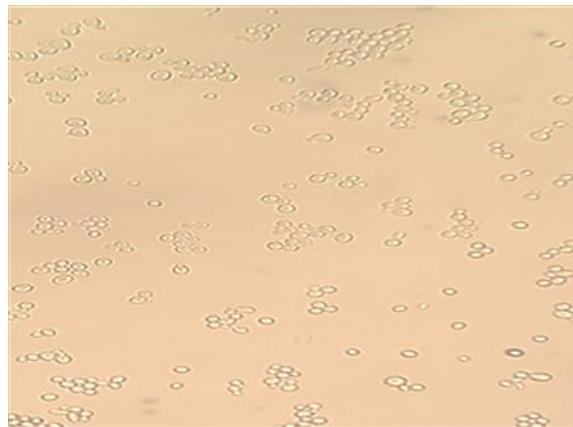
L'*Aspergillus* est un type de champignons commun, cosmopolite qui se développe sur les végétations en décomposition (Samson et al, 2004). Les aflatoxines sont des puissantes toxines, cancérigènes, mutagènes, des agents immunosuppresseurs produit sous forme de métabolite secondaires principalement par *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* qui sont présents dans l'air et le sol (Roston, 1997). L'aflatoxine B1 est considérée comme la plus toxique et peut causer le cancer du foie chez l'homme (Gropman et al, 1998). Selon Marasas et Nelson (1987) ; Moss (1996) les isolats d'*Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *A. carbunarius* produisant de l'OTA.



**La figure 10 : Image microscopique d'un mycélium du genre *penicillium spp* prélevé de l'échantillon du PSF de la dilution  $10^{-2}$**

La figure 10 montre une observation microscopique du mycélium caractérisant le genre *Penicillium spp.*

Les pénicilliums sont très généralement retrouvés dans le sol, sur les végétaux en décomposition et les produits alimentaires sec (**Laron, 1987**). Selon **Marasas et Nelson (1987)** ; **Moss (1996)** le *Penicillium verrucosum* produit de l'OTA. Ils ajoutent que la production d'OTA est fortement influencée par la composition de milieu principalement par la présence ou l'absence d'acides aminés. La phénylalanine son utilisation est très remarquable par *A. ochraceus* et *P. verrucosum* dans la biosynthèse de l'OTA (**Harri et Mantte, 2001**).



**Figure 11 : Image microscopique d'un amas de cellules caractérisant les levures prélevées de l'échantillon du PSF de la dilution  $10^{-3}$**

La figure 11 montre une observation microscopique des amas de cellules caractérisant les levures

Une levure est un champignon unicellulaire, se reproduisant par fission ou bourgeonnement. Les habitats naturels sont très variés. On peut trouver des levures quasiment partout où une source de carbone est disponible. Quelques levures sont des pathogènes opportunistes pour l'Homme. Des espèces de *Candida* sont prédominantes parmi les souches nosocomiales de certains hôpitaux. D'autres peuvent contaminer des aliments et des boissons en les rendant impropres à la consommation (**Bruno, 2019**).

Le pollen floral renferme une flore diversifiée de levure, qui diminuaient suit à la récolte par les abeilles et au stockage dans la ruche (**Gilliam, 1979**).

**Gilliam et al (1989)** ont identifié plus de six genres de levures (*Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Hansenela*, *Kloeckera*) à partir du pollen d'amande.

### 2.4. Discussion des résultats de l'observation microscopique

Selon **Gilliam et al. (1989)** la flore moisissure du pollen en pelote et du pain d'abeille peut résulter d'inoculation microbienne par les abeilles. La contamination fongique du pollen pourrait aussi être dû aux impuretés des pièges à pollen s'ils ne sont pas désinfectés avant la prochaine saison apicole (**Nedić et al., 2008**).

La forte hygroscopie du pollen d'abeille entrave la croissance des espèces de moisissures (**Bonvehi, 1987 ; Bonvehi et al., 1987**). Cependant, selon **Medina et al. (2004)**, les besoins en Aw faible expliqueraient la présence fréquente élevée d'*Aspergillus spp* et *Penicillium spp* dans le pollen d'abeille.

Les champignons toxigéniques se développent dans le pollen et produisent des toxines pathogènes si le séchage est retardé (**Bonvehi et Alegret, 1986**). La production ultérieure des mycotoxines dépend aussi des conditions climatiques. Une étude réalisée par **Krnjaja et al. (2013) ; Levic et al. (2013)** en Serbie montre que la récolte du pollen pendant la période de sécheresse (de juin à août) entraîne l'apparition des mycotoxines de haut risque telle que l'Aflatoxine B1.

Selon **Harley (1997)**, la présence des champignons dans les produits ne signifie pas nécessairement la présence des mycotoxines. Le contenu des mycotoxines n'est pas toujours en rapport avec le nombre de champignons présents (**Tarr, 2006**).

La valeur maximale recommandée de mycotoxines en été mise en place dans de nombreux pays pour le nombre du produit alimentaire, mais il n'y a pas de limites admissibles pour les mycotoxines dans le pollen d'abeille. La littérature scientifique sur la présence de mycotoxine dans le pollen est rare.

L'établissement des paramètres de qualité microbiologique pourrait faciliter l'inclusion de pollen d'abeille dans le Codex Alimentarius (**Kostić et al, 2019**).



# **Conclusion générale**

### Conclusion générale

A travers cette étude, nous avons essayé de déterminer l'effet de la conservation sur la qualité d'un pollen sec stocké (stocké une année) par rapport à celle d'un pollen sec frais (non stocké), et ce, par comparaison de leurs propriétés physicochimiques et microbiologiques. Cette étude nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

La teneur en eau du pollen sec frais de l'année 2019 est conforme à la norme d'Argentine qui est 8% et elle est plus basse que celle du pollen sec stocké 2018 qui dépasse la norme. Plus ces valeurs en eau sont faibles, plus elles témoignent d'une sécurité sanitaire et microbiologique compatibles pour un usage en alimentation humaine.

Les deux types du pollen sont conformes à la norme brésilienne (4 à 6). Ils ont tous les deux un pH acide, le PSS (5,16) et le PSF (5,86). Ces valeurs basses du pH pourraient être dues à une fermentation par les levures et moisissures et comme résultat de cette fermentation il y a l'acide lactique qui fait baissé le pH du milieu, cette acidité contribue à la diminution de la charge bactérienne pathogène du pollen, ce qui leurs confère une longue conservation.

Concernant les analyses microbiologiques, nous avons enregistré :

Le nombre de germes mésophiles totaux des échantillons du pollen sec stocké dépasse largement la norme établie par le code alimentaire Argentin qui a établi une valeur maximale de  $1,5 \cdot 10^5$  UFC/g de la flore mésophile. Par contre, le pollen sec frais est conforme à la norme. La charge relativement élevée enregistrée dans le pollen sec stocké pourrait être due à la charge initiale, au taux d'humidité et les conditions d'entreposage.

Le pollen sec frais présente une charge en coliformes totaux proches de celle enregistrée dans le pollen sec stocké, toutefois cette charge dépasse la norme fixée par **IHC** qui est 100 UFC/g. Cette charge relativement élevée en coliformes totaux peut témoigner d'un manque d'hygiène au cours des différentes manipulations (récolte, nettoyage, séchage et conditionnement).

Concernant les levures et moisissures, le pollen sec stocké et le pollen sec frais ont présenté des charges conformes à la norme **IHC**. Cependant, le pollen n'est pas antifongique, il peut être attaqué par les moisissures quand il est exposé à l'humidité, ce qui explique leur présence dans les échantillons du pollen étudiés. La charge relativement basse enregistrée dans le pollen sec stocké pendant une année peut nous renseigner sur les bonnes conditions de stockage.

Par contre, on note l'absence totale de la flore lactique et la flore pathogène (Staphylococcus et salmonella). La disparition des bactéries lactiques est due à l'abaissement du pH sous l'effet de la grande quantité d'acide lactique produite. Nous pouvons confirmer aussi que le pollen d'abeille possède une activité antibactérienne très importante vis-à-vis de la flore pathogène.

Cette étude est une contribution à la détermination de la qualité microbiologique du pollen local, les résultats ont montré que quelques échantillons dépassent les normes recommandées, plusieurs facteurs de risque liés à cette variabilité de la qualité hygiénique du pollen. Au niveau de rucher et de la miellerie : le manque d'hygiène dans la chaîne de production du pollen (récolte, séchage et mise en pot), au niveau des points de vente : une mauvaise conservation du produit. Il est important de considérer que ces microorganismes peuvent causer la détérioration et diminuer la durée de conservation, raison pour laquelle des programmes de contrôle de la qualité devraient être mis en œuvre.

A cet effet, d'autres études sont prévues pour mettre en évidence surtout les relations entre les conditions de récolte, de stockage et la qualité microbiologique, ceci afin de déterminer l'influence de l'apiculteur sur la détérioration de la qualité du pollen.

### Perspectives

- ✓ Dans l'intérêt d'apporter un complément à cette étude, il serait intéressant d'augmenter le nombre d'échantillon afin de mieux apprécier la qualité du pollen et pour une éventuelle contribution à l'élaboration de normes définissant la qualité hygiénique du pollen d'abeille.
- ✓ Rechercher la présence des champignons mycotoxigeniques dans le pollen d'abeille sec.
- ✓ Recherche des résidus de pesticides dans le pollen.
- ✓ Etudier la possibilité d'incorporer le pollen dans des produits alimentaires tels que : le yaourt, le jus de fruit et autres.



**Références  
bibliographiques**

- Abd El- Hady F. et Hegazi A., (1986).** Activité biologique du pollen, centre national de recherche, Dokki, Giza, Egypte.
- Alaux C, Brunet J L, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S et Cousin M., (2010).** Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*apis mellifera*). *Environmental Microbiology* 12: 774-82.
- Allmaraz-Abarca., (2007).** Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybeecollected pollen from mesquite (*prosopis juliflora*, leguminosae) *journal of food composition and analysis*, v. 20, p. 119-124.
- Almeida muradian L B; Pamplona L C; Silvia Coimbra et Barth Ortrud Monika., (2005).** « Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets », *Journal of Food Composition and Analysis* 18(1): 105-111.
- Amigou M., (2016).** Les résidus des médicaments vétérinaires et de pesticides dans les produits apicoles alimentaires (miel, pollen, gel é royale et propolis). Thèse de doctorat vétérinaire, faculté de médecine Créteil, Ecole nationale vétérinaire, faculté d'Alfort, pp.139, 27-41.
- Apimondia., (2001).** Standing commission of apitherapy *Traité d'apitherapie, La médecine par les abeilles [cederom]* V.1.01 PC-Mac Produit par Api-Ar International SA R Brussels. ISBN: 2-9600270-0-0.
- Ares A M., Valverde S., Bernal JL., Nozal M J. et Bernal J., (2018).** Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*: 147. 110–124.
- Avis de l'Agence nationale de securite sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail**, 27-31 av. du General Leclerc, 94701 Maisons-Alfort Cedex, le 15 mars 2012.  
[www.anses.fr](http://www.anses.fr)
- Al-Wali N., Salom K., Al-Ghamdi A and Ansari M.J., (2012).** Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. *The Scientific World Journal*.
- Argentina., (1990).** Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. *Alimentos. Código Alimentario Argentino. (Capítulo X : Alimentos Azucarados : Artículo 785-Resolucio 1550 de 12 de dezembro de 1990).*

- Belhadj H., Bouamra D., Dahamna S., Harzallah D., Ghadbane M. et Khennouf S., (2012).** Microbiological Sanitary Aspects of Pollen. *Adv in Env Biol*, 6(4): 1415-1420.
- Biri M., (2002).** Le grand livre des abeilles cours D'apiculture moderne. Ed. De Vecchi Paris.pp.260.
- Biri M., (2003).** Le grand livre des abeilles. L'apiculture moderne. Ed vecchi S.10e éd.
- Blanc M., (2010).** Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de limoges, Faculté de médecine et de pharmacie Aspects of Pollen. *Adv in Env Biol*, 6(4): 1415-142
- Bogdanov S., (2014).** Pollen: production nutrition and health: a review. Bee product science <https://www.bee-hexagon.net/Health/PollenBook2Review.pdf>
- Bogdanov S., Cherbuliez T. et Stangaciu S., (2006).** Produits apicoles et santé. AIP forum. (41f) p: 351.
- Bogdanov S., (2006).** Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37, 1-18.
- Bogdanov S., (2004).** Quality standars of bee pollen and beeswax. *Apiacta* 39 : 334-341.
- Bradbear N., (2010).** « Le rôle des abeilles dans le développement rural (Manuel sur la récolte, la transformation et la commercialisation des produits et services dérivées des abeilles ». Organisation des Nation Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome. 176p.
- Bruneau E., (2012).** Définition, contrôles et pratiques apicoles : impacte sur la qualité des produits de la ruche ([www.cari.be/medias/temporaire/become/bruneau\\_etienne.pdf](http://www.cari.be/medias/temporaire/become/bruneau_etienne.pdf))
- Bruneau E., (2011).** La récolte du pollen en pelote. (www. Cari-be.145-fiche(1).pdf)
- Bruneau Etienne et Robert Lequeux., (2009).** Guides de bonne pratique apicole. Louvain-la Neuve, Gant. Version 1 du 19/03/2009.
- Barreto L.M.R.C., Funari S.R.C., et Orsi R.O., (2005).** Composition and quality of bee pollen from seven Brazilian State and Federal District. *Bolitim de Indústria Animal*, 62, 167-175.
- Barthe C., J Perron et J.M.R Perron., (1998).** Guide d'interprétation des paramètres microbiologiques d'intérêt dans le domaine de l'eau potable. Document de travail (version préliminaire), ministère de l'Environnement du Québec, 155 p. + annexes.

- Benoit B.J., Y Jay., A.S Diana and Z.W Lawrence., (2004).** Mycoflora and fungal vector capacity of the parasitic mite *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies, *International Journal of Acarology*, 30(2): 103-106.
- Bogdanov S., (2012).** Pollen: collection, harvest, composition, quality. In *Bee Product Science (the pollen book)*; Chapitre 1; Available online:  
<http://www.bee.hexagon.net/pollen/collection-harvest-composition-quality/>
- Bonvehí S.J., (1987).** Etude de la conservation du pollen des abeilles, employé de fumigants. *La Défense des Végétaux* 243, 90-94.
- Bonvehí S.J., Alegret L.P. (1986).** Etudes microbiologiques du pollen d'abeilles. *Revue Française d'apiculture* 79, 259-266.
- Bonvehí S.J., Jordà E.E., (1997).** Nutrient composition and microbial quality of honeybee collected pollen in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 725-732.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F et Zucca J., (1988).** Microbiologie alimentaire. Aspect Microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Tome 1. Ed Technique et documentation, Lavoisier. Paris. p 161, p178.
- Brazilian Legislation, (2001).** 19 January 2001 Implementing Normative Instruction 3/MAPA/Brazil that approved the venom, beeswax, royal jelly, lyophilized royal jelly, bee pollen, propolis and propolis extract. *Union Official Diary section 1*, 23.01.2001.p.18.
- Bruno D., (2019).** Levure et métabolisme fermentaire  
<http://edu.mnhn.fr/mod/page/view.php?id=9128>
- Campos M.G.R., Bogdanov S., Almeida-Muradian L.B., Szczesna T., Mancebo Y., Frigerio C et Ferreira F., (2008).** Pollen composition and standardization of analytical methods. *Journal of apicultural research and bee World* .47 (2):156-163.
- Cherbuliez T et Domerego R., (2003).** L'apithérapie : médecine des abeilles. Amyris. 254p.
- Cherbuliez T., (2001).** CD-ROM. Apithérapie. Commission d'apithérapie d'Apimondia.
- Compos M., Frigerio C., Lopes J. et Bogdanov S., (2010).** What is the future of Bee-Pollen? *JAAS* 2: 131-144.
- Coronel B.B., Grasso D.S.C, Pereira G. et Fernández A., (2004).** Caracterización bromatológica del pólenapícola Argentino. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 15, 141-181.

**Claude., (2009).** La récolte du pollen. <http://l-abeille-et-le-bon-gout.over-blog.com/article-29949014.html>

**Da Silva Girliane Regina , Tamires Botelho da Natividade, Celso Amorim Camara, Eva Monica Sarmiento da Silva, Francisco de Assis Ribeiro dos Santos et Tania ria Sarmiento Silva., (2014)** «Identification of Sugar, Amino Acids and Minerals from the Pollen of Jandaíra Stingless Bees (*Melipona subnitida*)", Food and Nutrition Sciences.

**Dajoz I., (1993).** L'évolution de grain de pollen .In « grand larousse annuel ». Larousse Editions

**Dancy A., (2015).** Le Tao du pollen & L'Art des aiguilles et du Feu. Centre Imhotep.pp 42.

**Darrigol J.L., (1979).** Le miel pour votre santé: propriété thérapeutique de miel, du Pollen, de la gelée royal et de la propolis. Edition Dangles. France : p.140.

**Donadieu Y., (1983).** Le pollen : thérapeutique naturelle. Edition Maloine S.A ; 6ème Ed. Paris. ISBN2-224-00873-2.

**Duffield J.W., (1954).** Studies of extraction, storage and testing of pine pollen. Z. Forstgenetik. 3: 39-45.

**Da-Motta S., Valente Soares L.M., (2001).** Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. Food Additives and Contaminants 18, 630-634.

**De-Melo M.A.A., Estevinho M.L.M., Gasparotto Sattler J.A., Rodrigues Souza B., da silva Freitas A., Barth O.M., Bicudo Almeida-Muradian L., (2016).** Effect of processing conditions on characteristic of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. LWT Food Sci. Technol. 65, 808-815.

**Dustmann J.H et Gunst E., (1986).** Inhibins and bacteriostaticaction of bee bread, *4piacta*. N° 17. Pp: 51-S4.

**De-Melo M.A.A., Estevinho M.L.M F., Almeida-Muradian L.B., (2015).** A diagnostic of the Microbiological quality of dehydrated bee-pollen product in brazil. Lett. Appl.Microbiol, 61. 477-483.

**Everlyn Nguku., (2014).** Certification des produits de miel et de ruche selon les caracteristiques de l'UE. 20160414-cobtinenta-bee-health-training-1-3-certification-fe.pdf

**Edberg S.C., EW Rice., RJKarlin et MJ Allen., (2000).** Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of applied Microbiology*, 88: 106S-116S.

**Elmund G.K., MJ Allen et EW Rice., (1999).** Comparison of Escherichia coli, total coliform and fecal coliform population as indicators of wastewater treatment efficiency. *Water Environ. Res.*, 71:332-339.

**Estivenho L.M., Rodrigues S., Pereira A.P., Feás X., (2012).** Portuguese bee pollen Palynological Study nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science and Technology* 47, 429-435.

**Fanali C, Dugo L et Rocco A., (2013).** « Nano-Liquid Chromatography in Nutraceutical Analysis: Determination of Polyphenols in Bee Pollen », *Journal of Chromatography*. A 1313 (25 octobre 2013): 270- 74, doi:10.1016/j.chroma.2013.06.055

**Fatrcová-Sramková K., Nôžková J., Kčániová M., Máriás-syová M., Rovná K., et Stričík M., (2003).** Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and health, Part B*, 48, 133-138.

**Feás X., Pilar Vázquez-Tato M., Estivenho L., Seijas J.A., Iglesias A., (2012).** Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*. 8359-8377.

**Franco B.D.G.M et Landgraf M., (2005).** *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Athenneu.

**Gauthier M., (2014).** La récolte de pollen : un débouché supplémentaire à l'apportée de tous <https://www.apiservices.biz/fr/articles/303-la-recolte-du-pollen-un-debouche-supplementaire-a-la-portee-de-tous>

**Gharbi M., (2011).** Les produits de la ruche : Origine – Fonction naturelle – composition propriétés thérapeutiques Apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire. Thèse de doctorat en Médecine-pharmacie, Université Claude-Bernard- Lyon I, pp.221.

**Gilliam M, D.B. Prest, and B.J. Lorenz., (1989).** Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. *Apidology*, 20: 53-68.

**Gilliam M., (1979).** Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*. *Apidologie*, 10(1): 43-53.

- Gilliam M., (1983).** Examination of floral nectar of citrus, cotton, and Arizona desert plants for microbes. *Apidology*, 14(4): 299-302.
- Gonzalez G., Hinojo M., Mateo R., Medina A. et Jimenez M., (2005).** Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int. J. of Food Microbial*. 105(1): 1-9.
- Guiraud J.P., (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris.
- Gergen I., Radu F., Bordean D. et IsengardH D., (2006).** Determination of water content in bee's pollen samples by Karl Fischer titration. *Food Control* 17 (3): 176-179.
- Gilliam M et Prest D.B., (1987).** Microbiology of the feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. *J. invertebr. Pathol.* 49, 70-75.
- Gilliam M et Taber S. III., (1991).** Diseases, pest, and normal microflora of honey bees, *Apis mellifera*, fed 2, 4-D and antibiotics. *J. Invertebr. Pathol.* 24, 349-356.
- Gilliam M., Taber III S., Lorenz B.J. and Prest D.B., (1988).** Factors effecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. *J. Invertebr. Pathol.* 52, 314-325.
- Groopman J.D., Kian L.G., Kensler T.W., (1988).** Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *Critical Revue of Toxicology*, 19, 113-146.
- Human et Nicolson., (2006).** « Nutritional Content of Fresh, bee-collected and stored Pollen of *Aloe Greatheadii* Var. *Davyana* (Asphodelaceae) », *phytochimie* 67 n° 14 1486-92, Doi: 10.1016/j.phytochem.2006.05.023.
- Harley R.M., (1997).** Mycotoxin and Environmental Health. The Scottish Agricultural College, West Mains Road, Edinburgh, UK.
- Harris J.P et Mantle, P.G., (2001).** Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* 58, 709-716.
- IHC., (2008).** International Honey Commission. World Network of Honey and Bee Product Science. <https://www.ihc-platform.net>
- Jacques G et Claude J., (2008).** 250 réponses aux questions d'un ami des abeilles. Editions du Gerfaut. Paris. 215p

**Jeantet R., Croguennec T., Schuck P et Brull G., (2006).** Science des aliments : Biochimie, microbiologie, procédés, produits. Ed. Techniques et documentation, Lavoisier. Paris. P264.

**Kostić Z.A., Milinčić D.D., Petrović T.S., Krnjaja V.S., Stanojević S.P., Barać M.B., Tešić Ž.Lj, and Pešić M., (2019).** Mycotoxines and Mycotoxin Producing Fungi in Pollen: Review Toxins.

**Krnjaja V.S., Levic J.T., Stankovic S.Ž., petrovic T.S., Lukic M.D., (2013).** Molds and mycotoxins in freshly harvested maize. Proc Ant Sci. 124: 111-9.

**Laurian Robert S., Foster Elizabeth., Levesque-lemy Madleine., Routly Elizabeth., Wilkinson David et Gleddie Steve., (2004).** Le potentiel de fixer des limites au flux des trans-gènes en modifiant les protéines à la surface des grains de pollen. Agriculture et Agroalimentaire. Ottawa. Canada, bulletin IBP n °1.

**Louveaux J., (1968).** Etude expérimentale de la récolte du pollen. In : « traite de la biologie de l'abeille ». Tome 3. Ed. Masson et Cie. Pp : 174-202.

**Louveaux J., (1985).** Les abeilles et leurs élevages. Ed. OPIDA. 256p.

**Lacey J et Megan N., (1991).** Fungi colonizing cereal grain: their occurrence and water and temperature relationships. In: Chelkowski, J.(Ed), Cereal Grain –Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Elsevier Science, Amsterdam, pp 77-118.

**Layral G et Verling., (2001).** Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire. Centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine. P84, p24.

**Lević J., Gošić-Dondo S., Ivanović D., Stanković S., Krnjaja V., Bočarov-Stančić A. et Stepanić A., (2013).** An outbreak of *Aspergillus* species in response to environmental conditions in Serbia. Pesticide and phytomedicine (Belgrade), 28,3, 167-179.

**Libis E., (1971).** L'apiculture pour tous. Ed. Flammarion. Pp: 119-124.

**Massaux C., (2016).** Pollens : une composition d'intérêt ! Abeille et cire n°174.29-30.

**Melo et Almeida-Muradian, (2016).** «Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples». Microbiological Sanitary Aspects of Pollen. Adv in Env Biol, 6(4): 1415- 1420.

**Morais M., Moreira L., Feás X., et Estevinho L. M., (2011)** « Honeybee-Collected Pollen .from Five Portuguese Natural Parks: Palynological Origin, Phenolic Content, Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity », Food and Chemical Toxicology: An International

Journal Published for the British Industrial Biological Research Association 49, no 5 (mai 2011): 1096- 1101, doi:10.1016/j.fct.2011.01.020.

**Moreno Andrade VD, Saldaña Gutiérrez C, Calvillo Medina RP, Cruz Hernandez A, Vázquez crus MA, Torres Ruíz A, Romero Gomez S, Ramos López MA, Álvarea-Hidalgo E, López-Gaytan SB, Ramírez NS, Jones GH, Hernandez-Flores JL et Compos-Guillen J., (2018).** Microbial diversity in commercial bee pollen from Europe, Chile, and Mexico, based on 16S Rena gene amplicon metagenome sequencing. *Genome Announc* 6:e00247-18. Doi.org/10.1128/genomeA.00247-18.

**Mullin C., Frazier M., Frazier J., Ashcraft S., Simonds R., van Engelsdorp D. et Pettis J., (2010).** High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health, *PLoS ONE* Vol.5/3 e9754.

<https://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0009754>

**Marasas W.F.O et Nelson P.E., (1987).** *Mycotoxicology*. Pennsylvania State University, University Park, PA.

**Martin N.H., Trmčić A., Hsieh T-H., Boor K.J. et Wiedmann M., (2016).** The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1549.

**Medina Á., González G., Sáez J.M., Meteo R. et Jiménez M., (2004).** Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Syst. Appl. Microbiol.* pp 261-267.

**Morgano M. A., Milani R.F., Martins M.C.T. et Rodriguez-Amaya D.B., (2011).** Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fisher titration. *Food control*. pp 1604-1608.

**Moss M.O., (1996).** Mycotoxins. Centenary review. *Mycological Research* 100, 513-523.

**Nagai T, Inoue R, Inoue H et Suzuki N., (2002).** Scavenging capacities of pollen extracts from *Citrus Idaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals and DPPA radicals. *Nut Res*; 22: 519-26.

**Nevas M., Hielm S., Lindström M., Horn H., Koivulehto K. et Kokeala H., (2002).**

High prevalence of Clostridium botulinum types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction, International Journal of Food Microbiology vol. 72 1-2 p 45-52.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501006158>

**Nicolson S.W., (2011).** Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two, *zoologie africaine*.46 (2), 197-204.

**Nabas Z., Haddadin M. S.Y, Haddadin J. et Nazer I. K. (2014).** Chemical Composition of Royal Jelly and Effects of Synbiotic with Two Different Locally Isolated Probiotic Strains on Antioxidant Activities. Food Nutr. Sci, Vol. 64, No. 3, pp. 171-180.

**Nedić N., Miladinović M, Dugalić-Verndić N., Milosavljević S., (2008).** Dobra pčelarska praksa uslov kvalitetnije proizvodnje meda. XVI Naučno savetovanje sa međunarodnim učešćem « Kvalitetom I selekcijom u pčelarstvu k aEvropi» (pp.121-128), 9-10 februar, Poljoprivredni fakultet, Beograd.

**Nogueira C., Iglesias, A., Feás X., Estevinho M.L., (2012).** Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. Int. J. Mol. Sci. 11173-11187.

**Oudjet K., (2012).** Etudes & Enquêtes, le miel une denrée à promouvoir, Le miel en Algerie, Infos-CACQE No : 00/ [http : // www.Cacqe.org/fichier-étude/2.pdf](http://www.Cacqe.org/fichier-étude/2.pdf).

**OMS., (2000).** Directive de qualité pour l'eau de boisson ; volume 2-critères d'hygiène et documentation à l'appui. Organisation mondial de la santé, 2e Edition, 1050p.

**Pettigrew A., (2008).** Protégeons les abeilles des pesticides. Paris : Organisation mondiale de la santé animale. *Agrireseau (en ligne)*. <https://www.agrireseau.qc.ca/Rap/documents/b01gen08.pdf>

**Phillipe Jean Marie., (1999).** Le guide l'apiculture. Ed Edisud la calade.13090 Aix-en-Provence, pp. 209-228.

**Precie Du Sert Patrice., (2009).** Ces pollens qui nous soignent (Trédaniel éditeur).

**Prost J.P et le Conte Y., (2005).** Apiculture connaitre l'abeille. Conduire le rucher. Ed. Technique de documentation, Lavoisier, Paris. 579p.

**Pain J et Maugenet J., (1966).** Recherches biochimiques et physiologiques sur le pollen emmagasiné par les abeilles. Ann. Abeille 9, 209-236.

**Petrović T., Nedić N., Paunović D., Rajić J., Matović K., Radulović Z., Krnjaja V., (2014).** Natural mycobiota and aflatoxine B1 presence in bee pollen collected in Serbia. *Biotechnol. Anim. Husb.* 2014, 30, 731-741.

**Philippe J.M., (2007).** Le guide de l'apiculture, Edisud, Aix-en-Provence, France, p 27.

**Patterson T.F and Mcginnis M. R., (2009).** The fungi description. site Doctor Fungus. Mycoses Study Group

**Qian W.L., Khan Z., Waston D.G., et Fearnal E.J., (2008).** "Analysis of sugars in bee pollen and propolis by liquid exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry", *Journal of Food Composition and Analysis*, 78-83

**Ravazzi G., (2003).** Les autres produits de la ruche In « Abeilles et apiculture ». Ed: VECCHI, 118-121.

**Roulston., (2000).** What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interaction, or phylogeny. *Ecological Monographs* .v.70, p.617-643.

**Rustom I. Y. S., (1997).** Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food chemistry*, 59, 1, 57-67.

**Rabie C.J., Lübben A., Schipper M.A.A., Van Heerden F.R and Finchan J.E., (1985).** Toxigenicity of *Rhizopus* species. *International Journal of Food Microbiology*, p 263-270.

**Sauvager F., (2012).** Les produits de la ruche et la santé humaine. Montpellier.

**Sebaaoui Q., (2009).** Le miel, la gelée royale, le pollen, Viulleneuve D'ASCQ.pp.1-32.

**Stanley R.G et H.F Linskens., (1974).** Pollen: biology, biochemistry and management. Springer-Verlag, New York. 307 p.

**Samson R. A., Hoekstra E.S., and Frisvad J.C., (2004).** Introduction to food and airborne fungi. 7th, -389 p. Baarn, voor Schimmell cultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.

**Sylvie. F., (2009).** Les traitements acaricide : la lutte contre les acariens est un leurre ? ([http://leparticulier.lefigaro.fr/jcms/c\\_51737/les-traitements-acaracides-la-lutte-contre-les-acariens-est-elle-un-leurre.](http://leparticulier.lefigaro.fr/jcms/c_51737/les-traitements-acaracides-la-lutte-contre-les-acariens-est-elle-un-leurre))

**Shevtsova T., Kacaniova M., Garkava K., Brindza J and Petrova J., (2014).**

Contamination *Betulaverrucosa* Ehrh, pollen by microorganisms, Mycotoxins and heavy metals. J. Microbiol. Biotechnology Food Sci.

**Thibault M., (2017).** Le pollen apicole : ses propriétés et ses utilisations thérapeutiques.

Sciences pharmaceutiques.

**Tarr B., (2006).** Managing the Effects of molds and Mycotoxins in Ruminants. Shur-Gain

Nutreco Canada Inc.

**Yang EC, Chuang YC, Chen YL et Chang LH., (2008).** Abnormal foraging behavior

induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (*Hyenop-tera: Apidae*). Journal of Economic Entomology 101: 1743-8.

### Sites web :

- ❖ <https://carahanna97.weebly.com>
- ❖ <https://tse1.mm.bing.net>
- ❖ <http://www.inspection.gc.ca/aliments/information-pour-les-consommateurs/fiches-de-renseignements-et-infographies/manipulation-des-aliments/alteration-des-aliments/fra/1331585126472/1331585217459>
- ❖ <http://www.guide-des-aliments.com/dietetique/Information/Micro-organismes/AD-Moisissures-et-levures.html>
- ❖ <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-salmonelle-7912>
- ❖ [https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Bact%C3%A9rie\\_lactique](https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Bact%C3%A9rie_lactique)
- ❖ <http://www.inrsfr/metropol-Microorganismesaérobies.M-147.07/2016.p1-8>.



**Annexes**

## Annexes

---

### Annexes

#### Expression des résultats

Cas général : entre 15 à 300 colonies visibles à la surface du milieu de culture. Le cas général s'applique lorsque au moins une boîte de Pétri présente au minimum 15 colonies visibles à la surface du milieu de culture après incubation.

-Sélectionner les boîtes de Pétri exploitables pour le calcul. Ces boîtes correspondent à celles provenant de deux dilutions successives et dont au moins une boîte présente au minimum 15 colonies visibles à la surface du milieu de culture après incubation. Les boîtes présentant plus de 300 colonies visibles à la surface du milieu de culture après incubation ne sont pas exploitables.

-Calculer le nombre « C » d'UFC (**Unités Formant Colonies**) sur les boîtes exploitables correspondantes à l'aide de la formule suivante :

$$C = \sum_{i=1}^{i=4} C_i$$

Avec :  $\sum_{i=1}^{i=4} C_i$  : Somme des colonies comptées sur l'ensemble des boîtes de Pétri sélectionnées et exploitables (boîtes provenant de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies ; seules les boîtes correspondant à un nombre d'UFC inférieur ou égal à 300 sont considérées dans le calcul).

-Calculer la concentration « N<sub>p</sub> » (UFC/ml) en microorganismes cultivables dans la prise d'essai de l'échantillon à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{v(n_1 + 0,1n_2)d}$$

## Annexes

Avec

C : nombre d'UFC (unités formant colonies) observées sur l'ensemble des boîtes sélectionnées et exploitables (boîtes provenant de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies ; seules les boîtes correspondant à un nombre d'UFC inférieur ou égal à 300 sont considérées dans le calcul).

v : volume de la suspension étalée à la surface des milieux en ml (par exemple 0,1 ml).

n<sub>1</sub> : nombre de boîtes retenues à la première dilution (la plus faible).

n<sub>2</sub> : nombre de boîtes retenues à la seconde dilution (la plus forte)

d : taux de dilution correspondant à la dilution la plus faible retenue (d = 1 pour l'échantillon non dilué ; d = 0,01 pour la dilution au 1/100<sup>ième</sup> etc....).

- Les résultats sont arrondis à deux chiffres significatifs après la virgule et sont exprimés en UFC par ml dans la suspension cellulaire d'origine (**INRS, 2016**).

### Exemple :

Dilution	Boîte de pétrie	Résultat de comptage	Boîte retenues	N1	N2	D	C	N <sub>p</sub>	Résultat (UFC/ml)
1	N°1	10		2	1	1	189	90	90
1	N°2	100	X						
1/10	N°1	49	X						
1/10	N°2	30	X						
1/100	N°1	0							
1/100	N°2	0							
1/1000	N°1	0							
1/1000	N°2	0							
1/10000	N°1	0							
1/10000	N°2	0							
1/100000	N°1	0							
1/100000	N°2	0							

$$N = \frac{189}{1(2+0,1 \times 1)1} = 90 \text{ UFC/ML}$$

## Résumé

Le pollen est un aliment diététique complet de haute valeur biologique, en renfermant de précieux éléments nutritifs tels que les protéines dont les acides aminés essentiels, sucres, lipides, minéraux et vitamines. La composition chimique du pollen varie selon le genre et l'espèce botanique dont il provient. D'un point de vue hygiénique, la valeur microbiologique du pollen est le principal critère de sa qualité. Il est alors nécessaire de contrôler sa charge microbienne et en particulier l'absence des germes pathogènes et fongiques. On a contribué à une comparaison de la qualité d'un pollen sec stocké (pendant une année) et d'un pollen sec frais par évaluation de leurs caractéristiques physico-chimiques (l'Humidité et le pH) et microbiologiques afin de révéler la différence que peuvent avoir ces deux types de pollen. D'après nos résultats physico-chimiques nous avons constaté que la teneur en eau du pollen sec stocké est plus élevée que celle du pollen sec frais, cependant ils présentent les mêmes valeurs du pH. Concernant les résultats obtenus dans les analyses microbiologiques, on perçoit une grande charge en germes mésophiles totaux, levures et moisissures dans le pollen sec stocké (2018) que dans le pollen sec frais (2019), cependant ils ont des charges convergentes en coliformes totaux. On note par ailleurs l'absence totale des bactéries lactiques, des coliformes fécaux, des salmonelles et des staphylocoques dans l'ensemble des échantillons analysés.

**Mots clés :** Pollen, qualité microbiologique, pollen sec stocké, pollen sec frais.

## Abstract

Pollen is a complete dietary food of high biological value, containing valuable nutrients such as proteins including essential amino acids, sugars, lipids, minerals and vitamins. The chemical composition of the pollen varies according to the genus and the botanical species from which it comes. From a hygienic point of view, the microbiological value of pollen is the main criterion of its quality. It is then necessary to control its microbial load and in particular the absence of pathogenic and fungal germs. We contributed to a comparison of the quality of stored dry pollen (for one year) and fresh dry pollen by evaluating their physicochemical (Moisture and pH) and microbiological characteristics in order to reveal the difference that can have both types of pollen. Based on our physicochemical results we found that the water content of stored dry pollen is higher than that of fresh dry pollen, however they have the same pH values. Regarding the results obtained in the microbiological analyzes, one perceives a large load in total mesophilic germs, yeasts and molds in the stored dry pollen (2018) than in the fresh dry pollen (2019), however they have convergent charges in total coliforms. There is also a total absence of lactic acid bacteria, fecal coliforms, salmonella and staphylococci in all the samples analyzed.

**Key words:** Pollen, microbiological quality, stored dry pollen, fresh dry pollen.