

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA CROISSANCE DE QUELQUES SOUCHES DE *Listeria sp* ISOLÉES EN CÔTE D'IVOIRE

T.G. KAROU^{1,2}, J. ROCOURT⁴, M. DOSSO³ ET K.J. DIPOH¹

¹Laboratoire de Microbiologie et Sécurité des Aliments, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire - E-mail: agtkarou@hotmail.com.

²Unité de Formation et de Recherche (UFR) Biosciences de l'Université d'Abidjan à Cocody, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

³Laboratoire de Microbiologie et Sécurité des Aliments de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, 01 BP 490 Abidjan 01.

⁴Centre National de référence des *Listeria* et Centre collaborateur OMS pour la listériose d'origine alimentaire, Institut Pasteur de Paris, 28, rue du Docteur ROUX, 75724, Paris cedex 15 France. Fax 00(33) 01 45 68 89 53.

RÉSUMÉ

La recherche de *Listeria* dans l'écosystème de la Côte d'Ivoire n'ayant pas révélé la présence de souche de *Listeria monocytogenes*, nous avons réalisé le présent travail qui porte sur l'influence de la température sur quelques souches isolées en Côte d'Ivoire. L'influence de la température du milieu a été étudiée sur 3 souches de *Listeria innocua* (L.i.) (4, 10, 20, 30 et 45 °C) dont 2 provenant de Côte d'Ivoire (CLIP : 39862 et CLIP : 43481) et une de la collection de l'Institut Pasteur de Paris (IPP), une souche de *Listeria grayi* (CLIP : 43484) isolée en Côte d'Ivoire et une souche de *Listeria monocytogenes* (L.m.) de la collection de l'IPP. Les résultats montrent qu'à 4 °C, toutes les souches connaissent un développement très lent. Au bout de 48 h d'incubation, le nombre de bactéries en termes d'unités formant colonies (ufc) n'a pas le double de la population de départ. A 10 °C, les bactéries ont connu un développement lent ; elles ont cependant atteint le double de la population de départ après 43 h d'incubation avec un taux de croissance horaire de 0,023, pour *L.i* (IPP) et de 0,022 pour *L.i* (CLIP : 43481), *L.i* (CLIP : 39862) et *L.m* (IPP). A 20 °C, la croissance semble avoir été stimulée, car elle a été plus importante. La croissance optimale a été obtenue au bout de 16 h, avec des taux de croissance horaire de 0,0226 pour *L.m* (IPP), 0,032 pour *L.i* (IPP) et *L.i* (CLIP : 43481) et 0,242 pour *L.i* (CLIP : 39862). A 30 °C, la croissance de *Listeria* a été rapide, toutes les souches ont atteint simultanément un optimum de croissance en 12 h pour des taux de croissance horaire de 0,338 pour toutes les souches. A 45 °C, les *Listeria* sont multipliés activement pour atteindre l'optimum au bout de 12 h, avec des taux de croissance de 0,426 pour *L.m* et de 0,415 pour les autres espèces que sont les *L. innocua* (IPP : 39862 et CLIP : 43481). La souche de *L. grayi* (CLIP : 43484) est apparue très sensible à cette température. Ceci permet d'affirmer que, les souches de *Listeria* (*L. innocua* et *L. grayi*) isolées en Côte d'Ivoire n'ont pas été plus sensibles à la température que celle d'Europe (*L.m* et *L.i*).

Mots clés : *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, température de croissance, *Listeria grayi*, caractère cultural, Côte d'Ivoire.

ABSTRACT

**EFFECT OF CULTURE MEDIUM TEMPERATURE ON THE GROWTH OF *Listeria* SP; STAINS
FROM CÔTE D'IVOIRE**

Studies conducted in Côte d'Ivoire did not reveal the presence of *L. monocytogenes* (4, 10, 20, 30 and 45 °C) on some isolated strains of *Listeria*. The effects of temperature was studied on three strains of *L. innocua* (L.i.) of which two from Côte d'Ivoire (CLIP : 39862 and 43481) and one from Pasteur Institut collection (IPP) Paris ; one strain of *L. grayi* (L.g.) (CLIP : 43484) from Côte d'Ivoire. I. and *L. monocytogenes* (L.m.) strain form IPP collection. At 4 °C, all strains grew slowly, a rate of 0.023 for L.i. (IPP) and 0.022 for L.i. (CLIP : 43481), *L. innocua* (CLIP : 39862) and *L.m.* (IPP). At 20 °C, growth was stimulated, and became more important. The growth was optimal after 16 h, with rates of 0.226 for L.m (IPP), 0.232 for L.i (IPP) and L.i (CLIP : 43481) and 0.242 for L.i (CLIP : 39862). At 30 °C, growth was rapid, with all strains, reaching an optimal after 12 h with a growth rate of 0.338. At 45 °C, bacteria reached optimal growth after 12 h with a rate of 0.426 for L.m and 0.415 for the other species L.i (IPP, CLIP : 39862). *L. grayi* (CLIP : 43484) appears to be more sensitive to this temperature. In short, *Listeria* strains from C.I. (L.i and L. g) did not appear to be more sensitive to heat than those from Europe (L.m and L.i).

Keywords : *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, growth temperature, *Listeria grayi*, cultural character, Côte d'Ivoire.

INTRODUCTION

Listeria sp est une bactérie ubiquiste largement répandue dans tous les milieux qui, de ce fait, contamine l'homme à travers ses produits alimentaires. Cette bactérie, responsable de la listériose, est particulièrement résistante aux conditions du milieu extérieur où elle peut survivre pendant 1 à 2 ans (Audurier et Berche, 1988). La plupart des animaux d'élevage (bovins, caprins, porcins et volailles) et même l'homme sont des porteurs sains de la bactérie (Bojsen-Moller, 1964 ; Rocourt, 1979 et 1989) et la plupart des aliments consommés par l'Homme sont souvent contaminés par *Listeria monocytogenes* (*L.m*) (Nicolas *et al.*, 1989 ; Brackett, 1988 ; Breer et Schopfer, 1988). L'ampleur de la listériose d'origine alimentaire, a gravité et la fréquence des épidémies aux USA, au Japon, en Chine et surtout en Europe, a créé une psychose. Face à l'importance de plus en plus croissante de la maladie, les pays industrialisés ont instauré des normes qui exigent que *Listeria monocytogenes* soit absent dans 25 g de produits alimentaires (Beaujour, 1991 : FAO/OMS, 1991). Ces

mesures, causent d'énormes préjudices aux industries agro-alimentaires des pays développés comme l'industrie charcutière (rillettes) en France (1993 et 2000) et le pâté en Grande Bretagne (1987 - 1989) l'industrie fromagère en France (1995, 1997 et 1999) en Suisse (1983 - 1987) et aux USA (1985) (Catteau, 2000 ; Rocourt et Bille, 1997). Il est évident que ces mesures n'épargneront pas les Pays du sud (Pays en développement).

Cependant, alors que les cas de listériose se succèdent aux USA, en Europe et en France, où selon Goulet *et al.* (1993) 3 foyers dont 2 épidémiques et 1 sporadique ont été identifiés, très peu de publications font cas de l'existence de la bactérie en Afrique. En effet, en dehors de quelques cas révélés au Nigeria (Onyemelukwe *et al.*, 1983, Oni *et al.*, 1989), en Afrique du Sud et au Cameroun (Rocourt et Jacquet, 1982), la situation ne semble pas préoccupante en Afrique. En Côte d'Ivoire, par exemple, les travaux de Dodji (1993), Kaba (1992) et de Nanadoum (1992) sur des cultures de bactéries à 4 °C n'ont pu isoler aucune souche de *Listeria grayi* (L.g.). La présente étude porte

sur l'influence de la température de croissance des souches de *Listeria* isolées en Côte d'Ivoire et deux souches, dont une de (*L.i.*) et une souche de (*L.m.*) de la collection de l'Institut Pasteur de Paris.

L'objectif principal de ce travail est de déterminer l'impact de la température du milieu sur la croissance des bactéries *Listeria* et rechercher les raisons de l'absence de l'espèce (*L.m.*) en Côte d'Ivoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL

Souches bactériennes

5 souches de *Listeria* sp ont été utilisées à savoir dont : 2 souches de *Listeria grayi* (*L.g.*) (CLIP : 43484 et CLIP : 39862) isolées en C.I. ; 1 souche de *Listeria grayi* (*L.i.*) de l'IPP ; 1 souche de *Listeria innocua* (*L.i.*) de l'IPP ; 1 souche de *Listeria monocytogenes* (*L.m.*) de l'IPP.

Milieux de culture

Le milieu de culture est constitué d'un bouillon de culture TSB (Trypticase soya broth) de : la tryptone-sel comme diluant ; du bouillon coeur cervelle (BCC) ; et de la gélose TSA (*Trypticase soya agar*).

MÉTHODE

La méthode de numération utilisant la technique de dénombrement des cellules viables en milieu gélosé a été employée (Larpent, 1997).

Pour le dénombrement des bactéries viables en milieu solide après culture en bouillon le protocole suivant a été adopté: une série d'Erlenmeyers contenant

chacun 200 ml de bouillon TSB ont été ensemencés avec 2 ml d'une souche de *Listeria* en suspension pendant 24 h et mis à incuber dans des bain-maries agités aux températures de 4, 10, 20, 30 et 45 °C pendant 48 h. Chacune des souches de (*L.i.*) (CLIP : 43481 et CLIP : 39862), (*L.g.*) (CLIP : 43484) (*L. m*) (IPP) et (*L.i.*) (IPP) ont été ainsi traitées.

Au temps t_0 , 1 ml de milieu ensemencé a été prélevé et des dilutions allant jusqu'à 10^{-8} ont été réalisées dans la tryptone sel en tubes à vis. La suspension de départ et les différentes dilutions ont été ensemencées par étalement de 0,1 ml sur des géloses TSA (une boîte de gélose par dilution) et incubées à 30 °C pendant 48 h. Les dilutions dont les boîtes gélosées ont donné moins de 300 bactéries ont été comptées (NF ISO 7218). Le nombre total N de colonies a été déterminé suivant la norme NF ISO 7218 (version 1996) à l'aide de la formule :

$$N = \frac{\sum C}{V(n1 + 0.1n2) \cdot d}$$

Toutes les 4 h, 1 ml de bouillon de culture est prélevé ; les dilutions et les ensemencements ont été réalisés comme précédemment. Les temps de prélèvement, ont varié entre 0 et 48 h pour palier de 24 avec des dilutions et les ensemencements comprise respectivement entre 10^{-1} - 10^{-8} et 10^{-2} - 10^{-8} .

Pour chaque température, les temps de génération et le taux de croissance horaire des bactéries ont été déterminés pour les souches de *Listeria innocua* (*L.i.*) (CLIP : 39862 et CLIP : 43481) et *Listeria grayi* (*L.g.*) (CLIP : 43484) ainsi que pour les deux souches européennes de référence *L. m* (IPP) et *L. i* (IPP). (figures 1, 2, 3, 4 et 5).

Tableau 1 : Dilutions et ensemencements pour la détermination du nombre de bactéries formant colonie par unité de volume (ufc/ml) en fonction du temps.
Dilution and insemination for the determination of the number of bacterios in colonies per unit volume as a function of time.

Temps (h) de prélèvement.(h)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Dilutions effectuées.	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$	$10^{-1} - 10^{-8}$
Dilutions ensemencées.	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$	$10^{-2} - 10^{-8}$

RESULTATS

A 4 °C les souches expérimentées ont connu un développement lent (figure 1). En effet, au bout de 48 h d'incubation à cette température, le nombre de bactéries apparues n'a pas doublé comme prévu par rapport à la population bactérienne de départ pour toutes les souches étudiées. Le temps de génération et le taux de croissance horaire n'ont pu être déterminés.

A 10 °C (figure 2), les bactéries ont également connu un développement lent ; Après 43 h d'incubation, un doublement de la population bactérienne a été observée. Le temps de génération a été de 43 h 27 min pour L.i. (IPP) et de 43 h 35 min pour L.i. (CLIP : 43481), L.i. (CLIP : 39862) et L.m. (IPP). Les taux de croissance horaire ont été de 0,023 pour L.i. (IPP) et de 0,022 pour L.i. (CLIP : 43481), L.i. (CLIP : 39862) et L.m. (IPP).

A 20 °C (figure 3), la croissance des souches a été stimulée, à cette température, la croissance optimale a été atteinte au bout de 16 h pour toutes les souches. Le temps de génération a été de 4 h 25 min pour L.m. (IPP), 4 h 18 min pour L.i. (IPP) et L.i. (CLIP : 43481) et 4 h 8 min pour L.i. (CLIP : 39862). Le taux de croissance horaire a été de 0,226 pour L.m.

(IPP), 0,232 pour L.i. (IPP) et L.i. (CLIP : 43481) et 0,242 pour L.i. (CLIP : 39862).

A 30 °C (figure 4), la croissance des bactéries a été plus rapide. Toutes les souches ont atteint simultanément l'optimum de croissance au bout de 12 h d'incubation. Le temps de génération a été de 2 h 57 min. Le taux de croissance horaire a été de 0,338 pour toutes les souches étudiées.

A 45 °C (figure 5), les bactéries se sont multipliées activement pour atteindre un optimum au bout de 12 h. A partir de 24 h d'incubation, peu survie a été réduite. On note, d'autre part, que cette température ne permet pas la croissance de la souche de (*L. xg.*) (CLIP : 43484). Le temps de génération des L.m a été de 2 h 20 min, et celui des espèces innocua (IPP, CLIP : 39862 et CLIP : 43481) de 2 h 24 min. Les taux de croissance ont été de 0,426 pour L.m. et de 0,415 pour les autres espèces de (*L. i.*) (IPP, CLIP : 39862 et CLIP : 43481).

Les figures 3, 4 et 5 montrent, qu'après 16 h d'incubation, les courbes de croissance des trois souches de (*L. i.*) et celle de (*L. m.*) se sont superposées. A 10 °C (figure 2), on a observé une superposition des courbes des souches de (*L. i.*) avec celle de la souche de (*L. m.*) de la collection IPP.

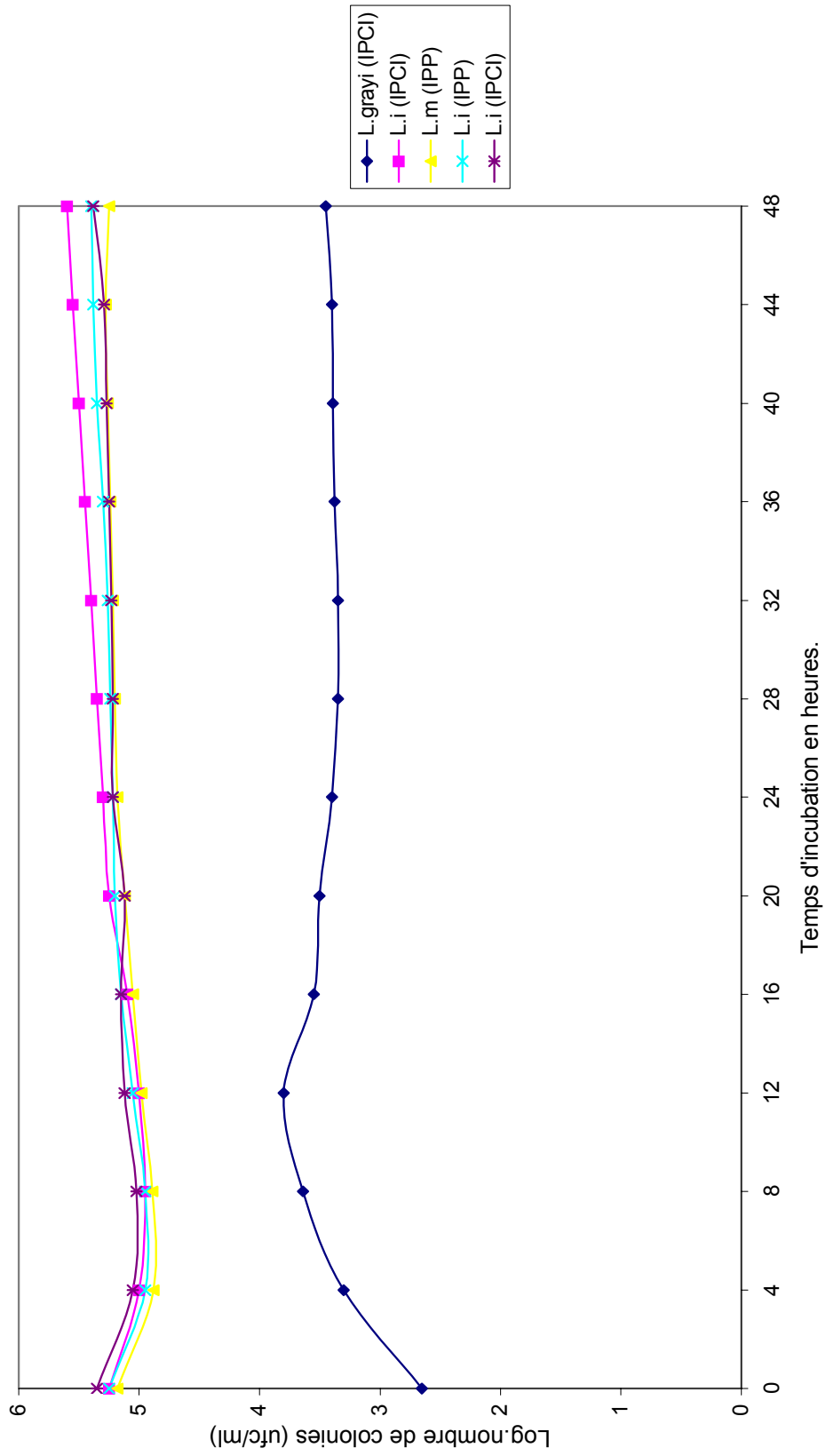


Figure 1 : Courbes de croissance des souches de *Listeria* à +4 °C.
Growth curves for listeria strains at 4 °C.

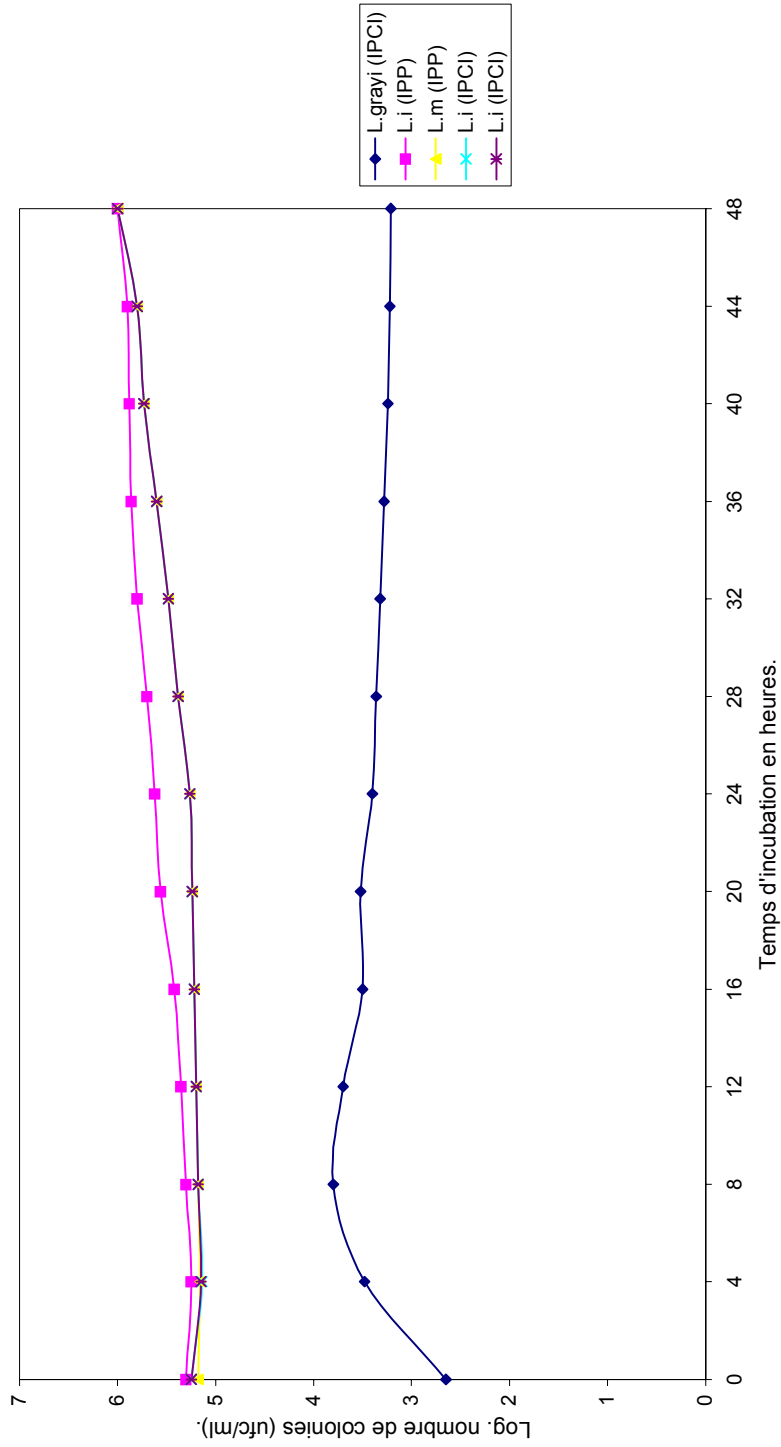


Figure 2 : Temps d'incubation en heures
Time of incubation (in hour).

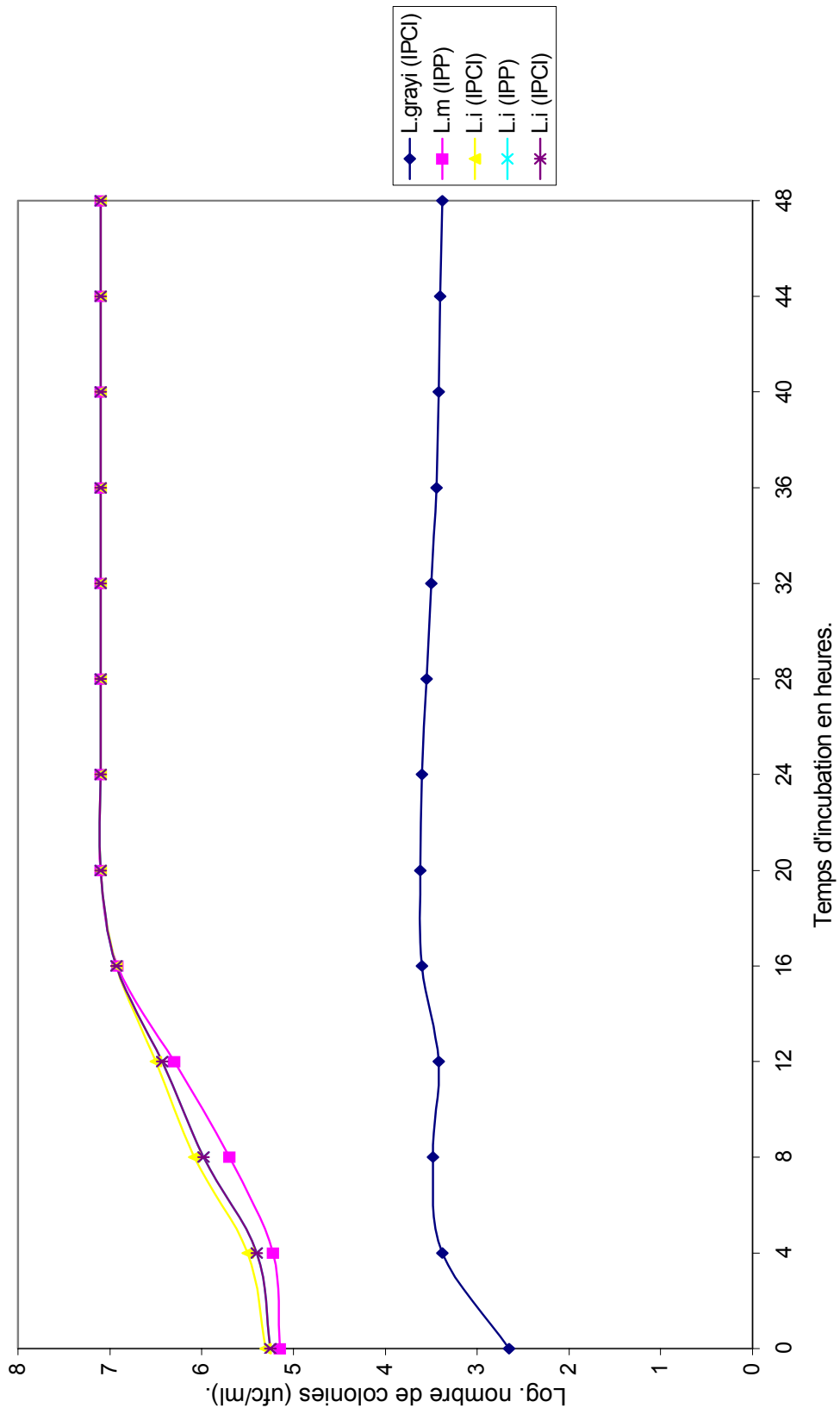


Figure 3 : Courbes de croissance des souches de *Listeria* à 20°C.
Growth curves of *Listeria* strains at 20 °C.

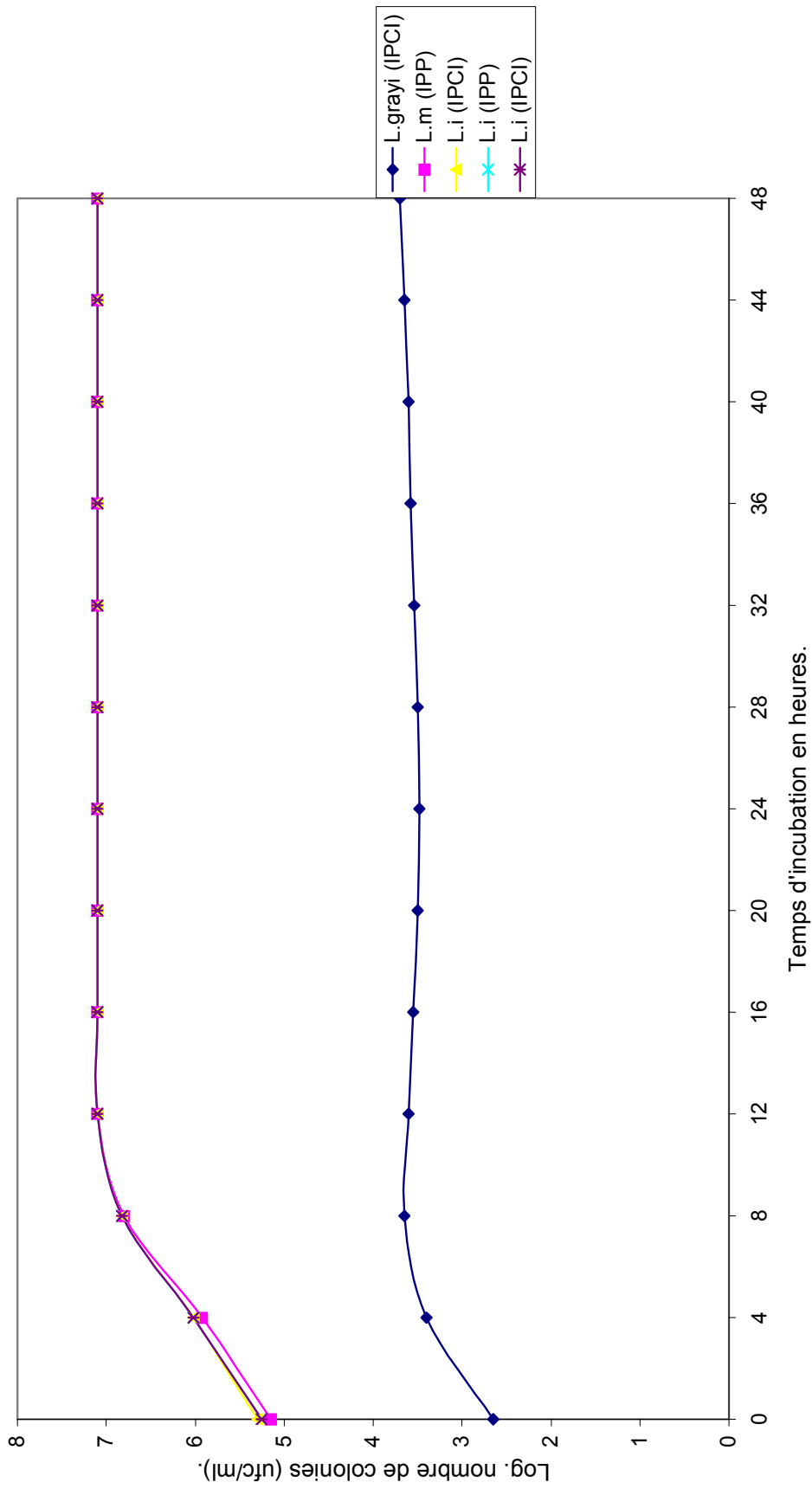


Figure 4 : Courbes de croissance des souches de *Listeria* à 30 °C.
 Growth curves of *listeria* strains at 30°C.

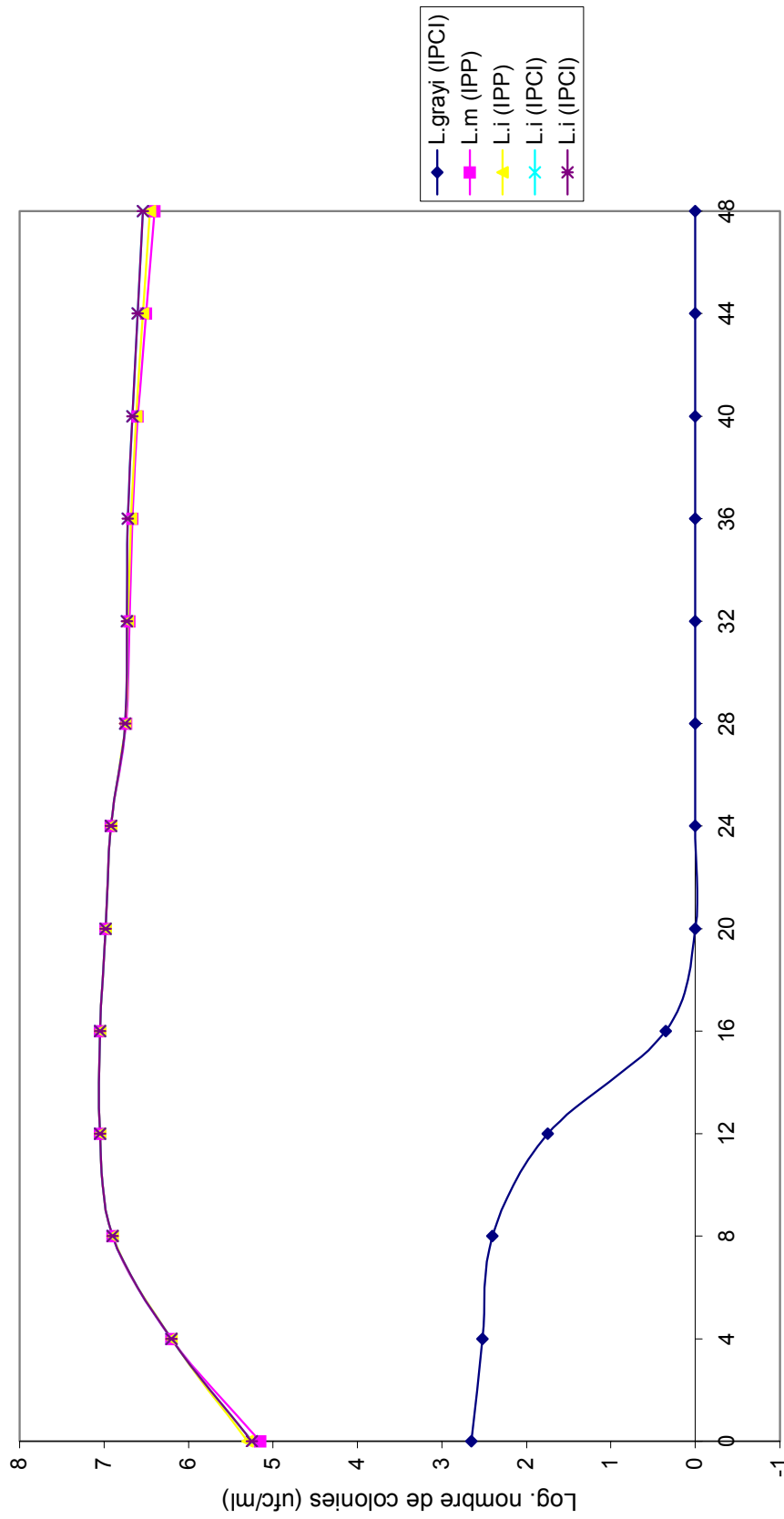


Figure 5 : Courbes de croissance des souches de *Listeria* à 45°C.
Growth curves of *Listeria* strains at 45 °C.

DISCUSSION

L'étude a montré qu'une température de culture 4 °C ralentit de façon significative la croissance des *Listeria* bien qu'elles soient des bactéries psychrotrophes. En effet, Rosenow *et al.* (1988) ont trouvé un temps de génération de 1,5 j à 4 °C et tandis que Thomas et Montville (1997) ont trouvé 30 h. Nous n'avons pas pu déterminer le temps de génération des souches testées à cette température.

La population bactérienne n'ayant pas doublé après 48 h d'incubation, nous n'avons pas pu déterminer le temps de génération correspondant à l'intervalle de temps entre 2 divisions successives, ou celui nécessaire au doublement de la population bactérienne. Pour la même raison, le taux de croissance horaire n'a pu être déterminé à cette température. Les taux de croissance horaire observés à 10°C [0,023 pour L.i. (IPP) et 0,022 pour L.i. (CLIP : 43481), L.i. (CLIP : 39862) et L.m. (IPP)] ont été par contre, en accord avec celles reportées par Thomas et Montville (1997) qui ont trouvé de valeurs de 0,023 à 5 °C pour L. m..

A 30 °C, toutes les souches ont atteint leur croissance optimale au bout de 12 h d'incubation. Ce résultat confirme l'avantage du choix de 30 °C pour la plupart des études sur L. m.. A cette température, la souche L. m. provenant de IPP et celles de Côte d'Ivoire ont présenté les mêmes caractéristiques. Ces caractéristiques seraient dues au milieu de culture et non de la température.

CONCLUSION

La température de culture du milieu n'a pas eu plus d'influence sur les souches de *Listeria* isolées en Côte d'Ivoire que sur celles d'Europe. En dehors de la souche de *Listeria grayi*, dont le taux de

croissance est en général faible, et qui est plus sensible à la température de 45 °C, toutes les autres souches ont présenté le même taux de croissance. La souche de *Listeria monocytogenes* n'a pas été plus affectée par les températures de 30 et 45 °C que les souches de *Listeria innocua*. Ceci permet d'affirmer que la température du milieu ne semble pas être un facteur responsable de la faible prévalence, voire de l'absence de *Listeria monocytogenes* en Côte d'Ivoire.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr. Jocelyne Rocourt, Christine Jacquet et le Centre National de Référence des *Listeria*, ainsi que l'OMS pour la listériose d'origine alimentaire à l'Institut Pasteur de Paris. Les Drs Pierre Formenty et Stéphanie Koblavi méritent également d'être remerciés.

REFERENCES

- ADURIER (A.) et (P.) BERCHE. 1988. *Listeria* in : (L.) Le Minor; (M.) Veron; "Bactériologie médicale", Paris Flammarion M. S., 559 - 569.
- ANONYME 1991. Recommandation concernant *Listeria monocytogenes*. Commission du *Codex Alimentarius* sur l'hygiène alimentaire, 25^e session du 28 octobre au 1^{er} novembre 1991.
- BEAUJOUR (A.). 1991. Fromage: La guerre Bactériologique. *Express international* du 27/12/91: 5.
- BOJSEN-MOLLER (J.) 1964. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in feces from healthy and sick persons. *Proc. Scand. Congr. Pathol. Microbiol.*, 14th Oslo, Norwegian university Press p.97-98. .
- BRACKETT (R.E.). 1988. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food. Technol.*; (April): 162-164.
- BREER (C.) and (K.) SHOPFER. 1988. *Listeria* and food. *Lancet* : 1022.

- CATTEAU (M.). 2000. Cours international de Microbiologie et Maîtrise de la sécurité alimentaire. Unité lait et produits laitiers. 29 mai au 9 juin 2000. Institut Pasteur de Lille.
- DODJI (K.). 1993. Essai d'évaluation de la présence de *Listeria monocytogenes* dans l'alimentation de bétail et de volaille. DEA de Biotechnologie et amélioration des productions végétales. Option Biotechnologie et Sciences des aliments FA.S.T / UNCI.
- GOULET (V.), (J.) ROCOURT, (I.) REBIERE, (Ch.) JACQUET, (C.) MOYSE, (P.) DEHAUMONT, (G.) SALVAT et (P.) VEIT. 1998. Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. *Journal of infectious disease* 1998; 177: 155-160.
- KABA (I.) 1992. Présence de *Listeria monocytogenes* dans le compost d'origine animale: essai d'évaluation du risque de contamination des aliments. DEA de Biotechnologie et amélioration des productions végétales. Option Biotechnologie et Sciences des aliments FA.S.T / UNCI.
- KAROU (T.G.) 1994. Etude des *Listeria* en Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat 3^e cycle Sciences et Biotechnologie des aliments. Option Microbiologie. FA.S.T/UNCI.
- LARPENT (J-P.). 1997. Microbiologie alimentaire : techniques de laboratoire. Lavoisier, Technique et documentation ; 1997.
- NANADOUM (M.). 1992. Essai d'évaluation de la présence de *Listeria monocytogenes* dans les stocks de maïs disponibles à Abidjan. DEA de Biotechnologie et amélioration des productions végétales. Option Biotechnologie et Sciences des aliments FA.S.T/ UNCI.
- NICOLAS (J.D.), (M.J.) CORNUEJOLS, (J.) HANGAR-VIDAUD, et (C.) BOSJIRAUD. 1989. Etude de la contamination des aliments destinés à la conservation humaine : viande, fromage, poisson. *Biologie*; 179 : 41 - 45.
- ONI (O.O.) (A.A.) ADESIYUN, (J.O.) ADEKEYE et (S.N.A.) SAPDU. 1989. Séro-prévalence des agglutinines à *Listeria monocytogenes* chez les animaux domestiques au Nigeria. *Revue Elev. Med. vét. Pays trop.*, 42 (3): 383-388.
- ONYEMELUKWE (G.C.), (R.V.) LAWANDE, (L.J.) EGLER, et (I.) MOHAMED 1983. *Listeria monocytogenes* in northern Nigeria, *J. infect.*, 6: 141-145.
- ROCOURT (J.) 1979 - 1989. *Listeria* et listériose humaine : la décennie 1979-1989, *Annales de l'institut pasteur / Actualités* p.25 -30.
- ROCOURT (J.) et (J.) BILLE. 1997. Foodborne listeriosis. Rapport trimestriel. *Statist. Sanit. mond.*, 50 (1997).
- ROCOURT, (J.) et (C.) JACQUET 1992. Listériose humaine. *Feuillets de Biologie*, - Vol. XXXIII - n 184.
- ROSENOW (A). 1988. *Listeria monocytogenes* (Congrès ASM). *Lett. Infectiol.*; 1988 ; 3: 496-498.
- THOMAS (J.) et MONTVILLE. 1997. Principles which influence microbial growth, survival, and death in foods. In: Michel P. Doyle et al. (éd). *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, 13-29, American Society for Microbiology, 1325 Massachusetts Ave; NW, Washington, DC 20005.