

Rapport Annuel d'Activité

2021

Centre National de Référence
Listeria

Années d'exercice
2019-2020

RESPONSABLE :

Marc LECUIT

RESPONSABLE ADJOINT :

Alexandre LECLERCQ

INGENIEUR :

Mylène MAURY (jusqu'en août 2020)

Alexandra MOURA (depuis août 2020)

MEDECIN CHERCHEUR :

Caroline CHARLIER-WOERTHER

TECHNICIENS :

Hélène BRACQ-DIEYE

Pierre THOUVENOT

Guillaume VALES

Nathalie TESSAUD-RITA

ASSISTANTE :

Andrée DIAKITÉ

AVANT-PROPOS

Le Centre National de Référence *Listeria* remercie l'ensemble de ses correspondants pour l'envoi des souches et de leurs informations associées, dans le cadre de la surveillance microbiologique de la listériose en France en 2019 et 2020, notamment dans le contexte de pandémie de SARS-CoV-2.

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent rapport, faite sans l'autorisation écrite du CNR Listeria est illicite. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées tout en mentionnant clairement les références de ce présent rapport (A. Leclercq, A. Moura, C. Charlier, and M. Lecuit. 2019-2020. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence Listeria – Année 2021. Institut Pasteur, Paris, France) dont elles sont issues.

RESUME

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2021 DU CNR *LISTERIA*

ANNEES D'EXERCICE 2019-2020

En 2019-2020, le Centre National de Référence *Listeria* (CNRL) a reçu et analysé 5288 isolats de *Listeria* [2020 : 2039; 2019 : 3249] dans le cadre de ses missions de surveillance dont : 747 isolats [2020 : 346; 2019 : 401] issus de 681 cas humains [2020 : 320; 2019 : 361], 2559 [2020 : 847; 2019 : 1712] isolats d'alertes produits, 769 [2020 : 251; 2019 : 518] isolats d'autocontrôles et 1213 [2020 : 595; 2019 : 618] isolats analysés dans le cadre d'investigations de clusters passés et d'étude de la biodiversité.

La méthode de typage moléculaire des isolats est le core génome MultiLocus Sequence Typing (cgMLST) obtenue à partir du séquençage du génome depuis 2015 au CNRL et devenu technique de première intention pour la surveillance microbiologique de *Listeria monocytogenes* en France depuis 2017.

En 2019-2020, 247 clusters [2020 : 123; 2019 : 131] ont été détectés par le CNRL et investigués en lien avec SPF et les autres partenaires de la cellule *Listeria*. Sur les 123 nouveaux clusters [2020 : 54; 2019 : 69], la source de contamination a été identifiée pour 22 d'entre eux, soit 18% [2020 : 6; 2019 : 16].

Le CNRL a aussi participé à la réponse aux alertes européennes à la plateforme EPIS (Epidemic Intelligence Information System) de l'ECDC [2020 : 7; 2019 : 20].

Le CNRL a publié des études de caractérisation de la biodiversité, virulence et résistance de *Listeria monocytogenes*, afin de mieux comprendre leur association aux différents types d'aliments, et leur pouvoir pathogène. Le CNRL a également publié des études sur la listériose materno-néonatale et les formes rares de listériose (infections endovasculaires et cutanées).

Le CNRL a participé à plusieurs demandes nationales et internationales d'expertises dans le contexte de la surveillance microbiologique et de la recherche sur *Listeria*.

SUMMARY

NRC *LISTERIA* 2021 ANNUAL ACTIVITY REPORT FOR YEARS 2019-2020

In 2019-2020, the National Reference Center *Listeria* (NRCL) received and analyzed 5288 isolates of *Listeria* [2020: 2039; 2019: 3249] as part of its surveillance missions, of which: 747 [2020: 346; 2019: 401] isolates from 681 [2020: 320; 2019: 361] human cases, 2559 [2020: 847; 2019: 1712] food alert isolates, 769 [2020: 251; 2019: 518] isolates from own-checks and 1213 [2020: 595; 2019: 618] isolates analyzed as part of past cluster investigations and biodiversity studies.

The method for molecular typing of isolates is the MultiLocus Sequence Typing core genome (cgMLST) obtained from genome sequencing since 2015 at the NRCL and which has become a first-line technique for the microbiological monitoring of *Listeria monocytogenes* in France since 2017.

In 2019-2020, 247 clusters [2020: 123; 2019: 131] were detected by the NRCL and investigated in conjunction with SPF and the other partners of the *Listeria* Unit. Of the 123 new clusters [2020: 54; 2019: 69], the source of contamination was identified for 22 of them, or 18% [2020: 6; 2019: 16].

The NRCL also participated in the response to European alerts to the ECDC's Epidemic Intelligence Information System (EPIS) platform [2020: 7; 2019: 20].

As part of its research activities, the NRCL has published characterization studies of the biodiversity, virulence and resistance of *Listeria monocytogenes*, to understand their pathogenic potential and association to food types. The NRCL has also published studies on materno-neonatal listeriosis and rare forms of listeriosis (endovascular and skin infections).

The NRCL has also participated in several national and international requests for expertise in the context of microbiological surveillance and research on *Listeria*.

TABLE DES MATIERES

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	8
1.1. ORGANISATION ET EVOLUTIONS INTERVENUES EN 2019-2020	8
1.2. ACCREDITATION	8
2. ACTIVITES D'EXPERTISE.....	10
2.1. EVOLUTION DES TECHNIQUES	10
2.2. TRAVAUX D'EVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES.....	10
2.3. TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES	10
2.4. COLLECTION DE MATERIEL BIOLOGIQUE	11
2.5. ACTIVITES D'EXPERTISE 2019-2020.....	11
2.6. ACTIVITES DE SEQUENÇAGE.....	13
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN FRANCE.....	15
3.1. DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES LABM	15
3.2. SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	15
3.3. CARACTERISATION DES SOUCHES D'ORIGINE NON HUMAINE REÇUES AU CNRL.....	29
3.4. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX.....	34
3.5. INTERFACE AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX.....	36
3.6. ENQUETE OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	42
4. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE ET ALERTE.....	44
4.1. SUSPICIONS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES	44
4.2. CLUSTERS CGMLST	44
4.3. TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES.....	45
4.4. ALERTES-PRODUITS DGAL	45
4.5. ALERTES PRODUITS DGCCRF	48
4.6. ENQUETES DES FORMES NEUROMENINGEES (ENQUETES « FRIGO »).....	48
4.7. «URGENT INQUIRIES» DE L'ECDC.....	49
4.8. EPIDEMIE	49
4.9. ENQUETE JUDICIAIRE	50
5. ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	51
5.1. CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE	51
5.2. CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES	54
5.3. CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC, ETC.).....	54
6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNRL.....	56
6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS EN 2019-2020	56
6.2. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE 2019-2020	65
7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX.....	69
7.1. COOPERATION	69
7.2. ECHANGES ENTRE LE CNR ET LE LNR.....	69
8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2021-2022	70
9. REFERENCES.....	71
ANNEXE A : ORGANISATION DU CNR.....	74
A.1. MISSIONS DU CNR	74
A.2. PERSONNEL PERMANENT	75

A.2. LOCAUX	76
A.3. EQUIPEMENT.....	77
A.4. MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE	78
A.5. MAINTIEN ET DETENTION DES BASES DE DONNEES DU CNRL.....	81
A.6. MANAGEMENT DE LA QUALITE ET HYGIENE/SECURITE AU SEIN DU CNRL.....	82
A.7. REGLEMENT GENERAL SUR LA PROTECTION DES DONNEES (RGPD).....	84
ANNEXE B : ACTIVITES D’EXPERTISE DU CNR <i>LISTERIA</i>.....	85
B.1. METHODES DE REFERENCES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES.....	85
B.2. TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL.....	86
ANNEXE C : DECLARATIONS PUBLIQUES D’INTERETS DES RESPONSABLES.....	90
ANNEXE D : AUTRES INFORMATIONS.....	96
D.1. PERMANENCE DU CNR	96
D.2. AUTORISATION MOT	96
D.3. AUTORISATIONS D’EXERCER LA BIOLOGIE MEDICALE.....	96

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

Abréviation / Acronymes	Dénomination
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANSES-LSA	Laboratoire de Santé animale de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARS	Agence Régionale de Santé
CES	Comité d'experts spécialisés
CCOMS	Centre Collaborateur de l'OMS des <i>Listeria monocytogenes</i>
CDC	Center for Diseases Control
CFU	Colonie Formant Unité
cgMLST	core genome Multi Locus Sequence Typing
CNRL	Centre National de Référence des <i>Listeria</i>
COM	Collectivité d'Outre-Mer
DG/DCCRF	Direction Générale / Départementale de la Consommation et de la Répression des Fraudes
DGAI	Direction Générale de l'Alimentation
DGS	Direction Générale de la Santé
DG SANTE	Direction Générale de la Santé et du Consommateur
DO	Déclaration Obligatoire
DROM-TOM	Département & Région et Territoire d'Outre-Mer
EFSA	European Food Safety Agency
ELITE	Epidemic Intelligence Information System
EHPAD	Etablissement d'Hébergement pour Personnes Agées Dépendantes
EQA	Essai d'intercomparaison – Essai externe de la qualité
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FWD	Food and Water-borne Diseases
GEA	Gastro-entérite aiguë
Iia	Sérovars 1/2a et 3a de <i>Lm</i>
Iib	Sérovars 1/2b, 3b et 7 de <i>Lm</i>
Iic	Sérovars 1/2c et 3c de <i>Lm</i>
IVb	Sérovars 4b, 4d et 4e de <i>Lm</i>
L	Sérovars 4a, 4ab et 4c de <i>Lm</i>
LABM	Laboratoire d'analyses de Biologie Médicale
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien ou Liquide Cérébro-Spinal (LCS)
InVS	Institut de Veille Sanitaire
INSEE	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
ISOPOL	International Symposium On Problems Of Listeriosis
<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LNRI	Laboratoire National de Référence des <i>Listeria monocytogenes</i>
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
MN	Materno-néonatal(e)
MS	Spectrométrie de Masse
N	Système nerveux central
NICD	National Institute for Communicable Diseases (South Africa)
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
PFGE	Electrophorèse en champs pulsé
S	Septicémie
SPF	Santé Publique France
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST	MLST sequence type (in French)
TESSY	European Surveillance System
UI	Urgent Inquiry (Alerte Européenne ECDC dans EPIS)

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

La Direction Générale de la Santé (DGS) a mis en place en 1982 la surveillance nationale de la listériose et créé le Centre National de Référence *Listeria*, d'abord localisé à la Faculté de Médecine de Nantes, auquel a été adjoint en 1990 le CNR pour la lysotypie et le typage moléculaire situé à l'Institut Pasteur.

L'Institut Pasteur héberge depuis 1993 le Centre National de Référence *Listeria* (CNRL), également Centre Collaborateur OMS *Listeria* (CCOMS) dont le mandat de 4 ans a été renouvelé en Novembre 2020. L'Institut Pasteur coordonne l'activité des CNRs placés sous sa responsabilité, et héberge différentes unités de recherche travaillant sur *Listeria* et d'autres entéropathogènes, ainsi que des plateformes technologiques permettant un accès privilégié à un large panel de techniques à haut débit et de grande technicité.

Le CNRL est en contact avec plus de 365 biologistes français, ainsi que les laboratoires vétérinaires départementaux, la DGCCRF et les laboratoires privés d'hygiène des aliments (environ 212 correspondants). Il est membre du réseau R2M des Biologistes médicaux français et en contact avec l'ensemble des laboratoires du contrôle officiel par l'ADILVA (Association Française des Directeurs et cadres de Laboratoires Vétérinaires Publics d'Analyses) et le LNRI ainsi que les laboratoires SCL de la DGCCRF.

En cas de crise sanitaire, le CNRL est en mesure de réceptionner des souches 24h/24h, 7j/7j, et pourrait bénéficier d'un renfort en personnel auprès de la cellule d'intervention d'urgence des risques biologiques (CIBU) de l'Institut Pasteur, dont des techniciens sont habilités aux méthodes du CNRL. En lien avec SpF, le CNRL a poursuivi ses activités de surveillance durant les périodes de confinement en 2020.

L'équipe du CNRL possède une expertise médicale clinique et microbiologique et une expertise en microbiologie alimentaire et sécurité sanitaire des aliments.

1.1. ORGANISATION ET EVOLUTIONS INTERVENUES EN 2019-2020

Le CNRL assure les missions définies par le décret n° 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et l'arrêté du 16 juin 2016 fixant le cahier des charges des Centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles, complétés par le cahier des charges spécifiques du CNR *Listeria* de Santé Publique France. L'arrêté du 7 mars 2017 fixe la liste des CNR pour la période du 1^{er} avril 2017 au 31 mars 2022.

L'ensemble de l'organisation du CNR est décrit en Annexes A et B de ce rapport. L'organigramme du CNRL est présenté en Figure 1.

En place au CNRL depuis 2015, le cgMLST (core genome MultiLocus Sequence Typing) est devenu depuis le premier Janvier 2017 la méthode officielle de typage génomique de référence pour la surveillance microbiologique de *Lm* en France.

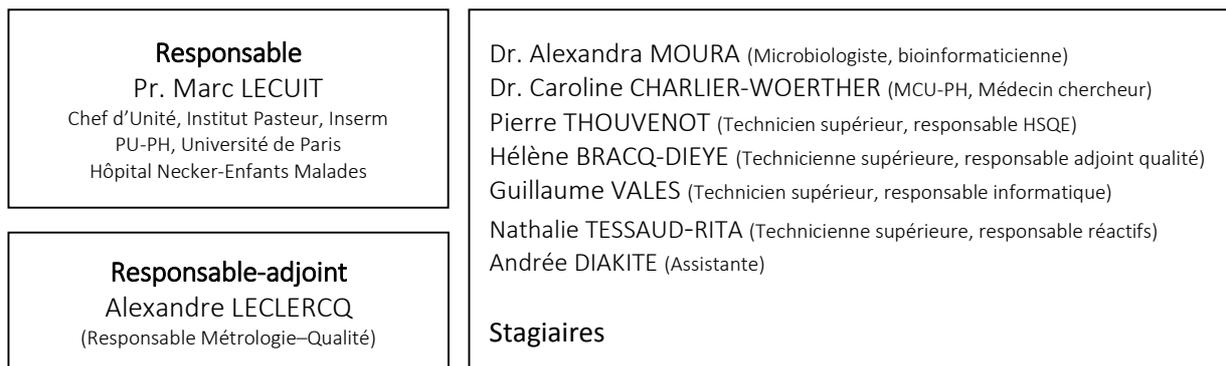
1.2. ACCREDITATION

Le CNRL était accrédité depuis 2015 par le COFRAC selon la norme EN ISO 15189 (Attestation d'accréditation N°8-2588 disponible sur le site web du COFRAC) et fait partie du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LRE-MS) de l'Institut Pasteur.

En avril 2019, le CNRL a été audité par le COFRAC au plan technique et management de la qualité, sans écart relevé. Cette accréditation représentait 100% de son activité à accréditer pour 2020 (Annexe B). Le CNRL n'effectuant pas d'actes de biologie médicale, le CNRL ne poursuit pas de processus d'accréditation, mais conserve sa démarche qualité.

Figure 1. Organigramme du CNR des *Listeria* au 15/06/21

Centre National de Référence et Centre Collaborateur de l'OMS *Listeria*



2. ACTIVITES D'EXPERTISE

ELEMENTS CLES DE 2019-2020

- 99,8% des souches réceptionnées d'origine humaine étaient bien identifiées à *L. monocytogenes*
- Délai de récupération des souches humaines : 6 jours
- Délai médian de restitution des résultats aux laboratoires réduit à 3 jours en 2020 grâce à la dématérialisation et à l'envoi sécurisé des comptes rendus
- 2926 en 2019 et 2216 en 2020 souches séquencées de *Listeria* dans le cadre de la surveillance microbiologique nationale des *Listeria*

La description des techniques disponibles au CNRL est décrite dans l'Annexe B.

2.1. EVOLUTION DES TECHNIQUES

VALIDATION DE NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC

Le CNRL a validé la méthode par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour l'identification des espèces du genre *Listeria* (1).

Pour le typage moléculaire, la méthode de cgMLST développée CNR en 2014 est la méthode de typage de référence des *Listeria monocytogenes*, permettent à ce jour de différencier les souches en plus de 9,000 cgMLST types (Moura *et al.*, 2016; <http://bigsdbs.pasteur.fr/listeria>).

2.2. TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES

PCR syndromiques

En collaboration avec le Dr Agnès Ferroni, LABM de l'Hôpital Necker-Enfants malades

Après consultation du réseau R2M des biologistes Français, les deux kits utilisés par la grande majorité des utilisateurs sont la PCR syndromique FILM ARRAY (bioMérieux, Marcy l'Etoile) pour les échantillons de sang et de LCR et le kit commercial de PCR monoplex RealCycler LIST-U/LIST-G (Orgentec SASU, Trappes) (2-6).

Le CNRL a reçu 4 LCR en expertise négatifs en kit Filmarray Méningites/Encéphalites (bioMérieux, Marcy l'Etoile) alors que la culture a donné un résultat positif et une PCR spécifique *Lm* négative. En 2019-2020, le CNR a identifié un cas de LCR positif en kit Filmarray Méningites/Encéphalites (bioMérieux, Marcy l'Etoile) ainsi qu'une PCR spécifique *Lm* positive, alors que la culture était négative, dans un contexte clinique non évocateur d'un cas de neurolistériose.

2.3. TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES

Le CNRL utilise la méthode de typage cgMLST et la transfère aux laboratoires demandeurs. Il a ainsi formé des biologistes du Réseau des Instituts Pasteur pour l'analyse cgMLST de génomes de *Lm*.

En 2020, le CNRL a transféré sa méthode de coproculture à *Listeria monocytogenes* à l'APHP dans le cadre du PHRC FECES pour tester l'intérêt de la transplantation de microbiote fécal (TMF) pour décoloniser les patients porteurs de bactéries hautement ou multirésistantes aux antibiotiques (BMR/BHR) (Pr V. de Lastours, Hopital Beaujon, Clichy), et au CH de Poitiers.

Le CNRL effectue également la gestion et curation de la base de données internationale des génomes BIGSdb-*Listeria* (A. Moura), et assiste biologistes médicaux et chercheurs dans l'analyse de leurs données.

2.4. COLLECTION DE MATERIEL BIOLOGIQUE

Le CNRL possède deux collections inventoriées issues de son activité propre :

- celle des souches de référence qui a été complétée en 2019-2020 avec l'espèce *L. valentina* et *L. ilorinensis* (en cours de publication);
- celle des souches de l'activité de CNR *Listeria* qui a été complétée en 2020 de 1869 souches supplémentaires (2019 : 2631 ; 2018 : 1942).

L'organisation, l'inventaire, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de ces souches sont décrits dans l'annexe A.

2.5. ACTIVITES D'EXPERTISE 2019-2020

DE LA RECEPTION DES SOUCHES AU RENDU DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE

Les souches réceptionnées et les analyses effectuées sont décrites dans le Tableau 1.

En 2019-2020, le CNRL a reçu également 1213 (2020 : 595, 2019 : 618) souches isolées de patients ou d'aliments adressées par des laboratoires étrangers (Allemagne, Colombie, Costa Rica, Danemark, Espagne, Nigeria) ou de produits importés pour expertise, dans le cadre de ses activités de Centre Collaborateur OMS. Le CNRL a également reçu 769 (2020 : 251, 2019 : 518) souches d'origine environnementale et/ou alimentaire adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour identification et caractérisation (autocontrôles, prestations payantes). Ces isolats sont aussi intégrés à la surveillance nationale, en respectant la confidentialité des données, qui peuvent être mises à la disposition des autorités qui en feraient la demande au CNRL.

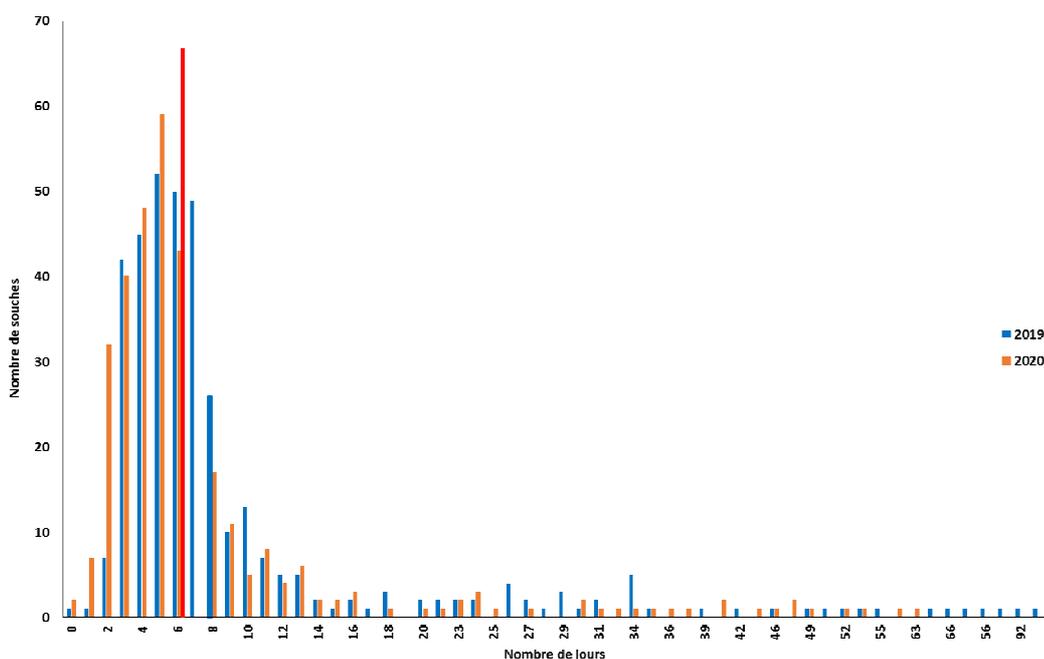
Tableau 1. Souches réceptionnées au CNRL en 2019-2020 et analyses effectuées

Nombre de souches		Origine	Pourcentage de fiches de données réceptionnées	Provenance	Identification	PCR séro-groupe	Antibiogramme	Séquençage et cgMLST
2020	2019							
301	335	Humaines	100%	Centres Hospitaliers	100%	100%	100%	100%
45	66	Humaines	100%	Laboratoires Privés	100%	100%	100%	100%
847	1712	Alimentaires et environnementales (Alertes)	100%	Laboratoires de Microbiologie alimentaire	100%	100%	0%	100%
251	518	Alimentaires et Environnementales (Autocontrôles, intégrés à la surveillance nationale)	100%	Laboratoires de Microbiologie alimentaire	100%	100%	0%	100%
595	618	Humaines, Alimentaires et Environnementale (Investigation historique de clusters)	100%	CNRL	100%	100%	0%	100%
TOTAL : 2039	3249	-	100%	-	100%	100%	100% des souches humaines	100%

Délai identification / réception

Le **délai médian entre le prélèvement et la réception** des souches au CNRL est de 6 jours (Figure 2) (2019 et 2018 : 6 jours). Les délais extrêmes s'expliquent par le temps écoulé entre déclaration obligatoire et réception de la souche au CNRL, malgré les relances effectuées par SPF. En 2019 et 2020, dans le contexte de la pandémie SARS-CoV2, la récupération des souches humaines a été plus difficile que les autres années malgré le caractère obligatoire de la déclaration des cas.

Figure 2. Distribution des délais entre le prélèvement et la réception au CNRL pour les souches d'origine humaine réceptionnées en 2019 et 2020 (médiane en rouge)



Non-conformité de souches

La détermination de l'espèce *L. monocytogenes* par les laboratoires d'analyse médicale (LABM) repose de façon croissante sur la méthode de spectrométrie de masse (MS) MALDI-TOF. Les biologistes rapportent toutes ambiguïtés d'identification au CNRL et envoient les souches pour confirmation. En 2017-2018, le CNRL a publié ou a participé à la publication d'évaluations de l'identification de l'espèce et du genre *Listeria* par MALDI-TOF (1, 7). Celle-ci est excellente à l'exception de certaines espèces de *Listeria* décrites depuis 2009, mais jamais isolées en clinique à ce jour (1). La spectrométrie de masse remplace depuis août 2016 la méthode API-*Listeria* (bioMérieux) comme méthode de détermination du genre et de l'espèce au CNRL. Le CNRL utilise une extraction totale des protéines pour la préparation de son dépôt alors que les Biologistes utilisent un dépôt direct, plus rapide et moins onéreux, mais pouvant aboutir à quelques résultats douteux.

Parmi les souches qui nous ont été adressées en 2019 et 2020, **la détermination de l'espèce quel que soit leur origine était correcte dans 99,8% des cas** (vérifiée par séquençage). 99,7% des souches humaines furent bien identifiées comme *L. monocytogenes* (identifications erronées : souches de *Brevibacterium paucivorans* et *Corynebacterium* sp.).

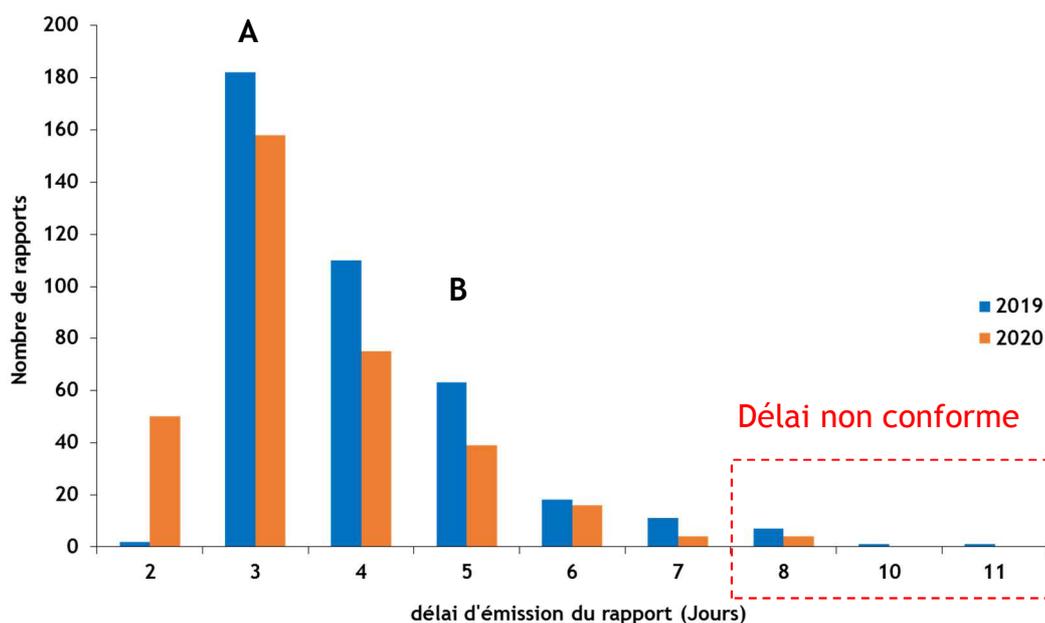
Envoi du rapport d'essai

Le **délai médian entre réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai** (incluant l'identification de l'espèce et le groupage PCR) a été de 3 jours en 2020 (4 en 2018 et 2019) (Figure 3), ce qui correspond au délai cible de 4 jours du système qualité du CNRL.

Le CNRL en 2020 a mis en place durant le confinement pour l'ensemble des envois de ses comptes rendus une version dématérialisée par messagerie sécurisée mybluefiles (<https://mybluefiles.com/fr/>).

Le délai peut s'allonger si (i) les souches sont adressées après le mercredi ou lorsque des jours fériés décalent la date d'obtention des résultats à la semaine suivante (+3 jours) et (ii) en cas de nécessité de purification de la souche, de tests phénotypiques complémentaires ou de souches nécessitant plusieurs essais de mises en culture. Les délais non-conformes (2,3% des souches humaines en 2019 et 2020) étaient tous liés à des difficultés techniques, des jours non ouvrés ou à l'identification de bactéries non-*Listeria*.

Figure 3. Distribution des délais entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai pour les souches d'origine humaine réceptionnées en 2019 et 2020 (A, rapports d'analyses sans week-end ; B, rapports d'analyses avec week-end et jours fériés)



2.6. ACTIVITES DE SEQUENÇAGE

En 2019-2020, le CNRL a séquençé 5142 souches de *Listeria* (2019 :2926 ; 2020 : 2216) dans le cadre de son activité continue de surveillance (n=2565 en 2019 et n=1915 en 2020) et d'études des investigations, clusters et épidémies (n=361 en 2019 et n=301 en 2020) au niveau national, européen et international. La différence avec le nombre de souches réceptionnées au CNRL vient des abandons d'analyses lors d'alertes produits ou de souches non-*Listeria*.

Le CNRL réalise l'extraction d'ADN génomique et le séquençage est effectué selon la technologie Illumina par la plateforme de microbiologie mutualisée (P2M) de l'Institut Pasteur (8), deux à trois fois par semaine. Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et séquençées par un équipement NextSeq 500 (Illumina). Les données sorties du séquenceur (reads) sont traitées et assemblées automatiquement en utilisant le logiciel SPAdes (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>), sous la supervision du bioinformaticien de la plateforme P2M (Alexis Criscuolo). Le CNRL effectue du contrôle qualité de ces assemblages et les dépose dans son projet privé de la base BIGSdb-*Listeria* (<https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>) pour déterminer le génotype, le type MLST, le type cgMLST, et le virulome, resistome de ces souches (9). Ces données privées peuvent devenir publiques avec l'accord de leurs propriétaires. Elles sont ensuite colligées dans la base nationale de surveillance Française dans bioNumerics version 7.6 afin d'abonder les clusters connus et en détecter de nouveaux. Les analyses de cgMLST peuvent être complétées par des analyses wgSNPs (analyse de la totalité du génome), si nécessaires.

Ce pipeline de génomique pour la surveillance nationale a été développé par un chercheur postdoctoral de l'Unité de Biologie des Infections, et en collaboration avec Sylvain Brisse (9). Cette méthode de typage a été validée pour la surveillance en France en collaboration avec SPF, et publiée en 2017 dans Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, Hamelin E, Laurent E, Fredriksen N, Van Cauteren D, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Tessaud-Rita N, Maury MM, Alexandru A, Criscuolo A, Quevillon E, Donguy MP, Enouf V, de Valk H, Brisse S, Lecuit M. 2017. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerg Infect Dis* 23:1462-1470.

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN FRANCE

ELEMENTS CLES DE 2019-2020

- Taux d'exhaustivité de réception des souches humaines de 95% en 2020 et 97% en 2019, et des souches d'alertes produits de 71% en 2020 et 72% en 2019
- Nombre de cas de listériose en 2019 (361 cas) en augmentation avec prédominance des bactériémies
- Âge médian stable des cas à 76 ans en 2020 et 77 ans en 2019
- Principale cause des rappels produits alimentaires en 2020 (23%) et 2019 (26%) avec les aliments suivants : fromages, charcuteries, saumons (source site web RappelConso, DGCCRF)
- Intérêt d'incorporer dans la surveillance les souches d'origine vétérinaire
- Nouveaux clusters dont la source alimentaire a été identifiée par cgMLST : 11% en 2020 et 23% en 2019
- Structures 2019-2020 de la population des souches de *Listeria monocytogenes* françaises stable
- Activité continue du CNRL en 2020.

3.1. DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES LABM

En 2020, les laboratoires expéditeurs des souches cliniques (n=276) sont à 86% (84% en 2019) hospitaliers, reflétant la sévérité de la listériose. Les autres structures sont des laboratoires privés 16% (16% en 2019). La listériose étant une maladie à déclaration obligatoire, le réseau du CNRL couvre le territoire français incluant métropole et DROM-TOM-COM.

3.2. SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS

3.2.1. Définition des cas

En France

Les cas de listériose humaine sont classés en forme materno-néonatale et non materno-néonatale :

- Un cas de **listériose materno-néonatale** est un cas où *Lm* est isolée d'une culture d'un site, le plus souvent physiologiquement stérile, chez la femme enceinte, le fœtus, des prélèvements périnataux ou du nouveau-né (≤ 28 jours). La mère et son enfant comptent pour un cas.
- Un cas de **listériose non materno-néonatale** est un cas où une souche de *Lm* est isolée d'un site, le plus souvent physiologiquement stérile, chez un sujet de plus de 28 jours (femme enceinte exclue). Il peut s'agir :
 - d'une **forme septicémique (S)** définie par la présence de *Lm* dans une hémoculture, en l'absence d'argument pour une atteinte neurologique ;
 - d'une **forme neurologique (N)** définie par la présence de *Lm* dans la culture d'un liquide céphalo-rachidien (LCR), dans le contenu d'un abcès cérébral, ou dans une hémoculture chez un patient avec atteinte neurologique clinique ou neuroradiologique (sans diagnostic alternatif) ;

- d'une **autre forme (A)** définie par la présence de *Lm* dans un prélèvement non-fécal et non-sanguin, materno-fœtal ou cérébral.

On distingue les cas sporadiques et les cas groupés. Les cas groupés (appelés clusters, dus à des souches présentant les mêmes caractéristiques microbiologiques) constituent une épidémie avérée lorsque la source de contamination alimentaire est identifiée. La plupart des cas de listériose sont sporadiques, bien qu'une partie de ces cas sporadiques puisse être de clusters de sources communes non identifiées.

Le système de surveillance de la listériose du CNRL se fonde sur l'étude des souches adressées volontairement par les biologistes. Il s'agit donc d'un système passif. Le nombre d'isolats reçus au CNRL est très voisin du nombre de cas déclarés dans le cadre de la déclaration obligatoire, démontrant la quasi-exhaustivité du recueil des souches cliniques des cas déclarés. Le bilan présenté concerne tous les cas pour lesquels un prélèvement positif à *L. monocytogenes* a été effectué à l'année n avec une souche reçue et caractérisée par le CNRL. Ceci inclut également des souches reçues au CNRL au cours du premier trimestre n+1 pour des cas déclarés en n, compte tenu des délais d'acheminement des souches après la déclaration.

Proposition de modification en Europe

En Juin 2018, la Commission Européenne SANTE C3 a publié un amendement (Implementing act to the Decision 1082/13) de la liste des « EU/EEA reportable diseases » et de leurs définitions pour amender la définition européenne des cas de listériose en incluant la détection d'acides nucléiques de *L. monocytogenes* comme alternative à l'isolement par une méthode par culture pour définir un cas confirmé en Europe de listériose (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L.2018.170.01.0001.01.ENG>).

S'agissant d'une maladie à la déclaration obligatoire, SPF enregistre également les cas de listérioses sans isolement de souches principalement issues de diagnostics par qPCR simplex ou syndromiques même si le formulaire CERFA demande l'isolement de la souche.

3.2.2. Analyse globale des cas de listériose

Nombre total de cas

Durant l'année 2020, le CNRL a reçu 346 souches humaines (404 en 2019) liées à 334 cas (373 en 2019) d'infections humaines déclarées à SPF en France métropolitaine. La différence observée entre nombres de souches et de cas est liée à l'existence de souches envoyées à l'année n+1, de doublons voire triplicatas de souches (n=27 ; 2019 : n=38) par patient, des souches non conformes (n=2 (5 en 2019) ; tubes cassés, etc.) non pris en compte dans l'analyse finale.

Un cas est un patient anglais ayant consommé de la « Mecha » impliquée dans l'épidémie espagnole de 2019 et ayant déclaré une listériose lors de sa traversée de la France pour revenir chez lui. Un autre cas en 2019 est une patiente qui a déclaré une listériose à Lourdes, et venait d'Italie.

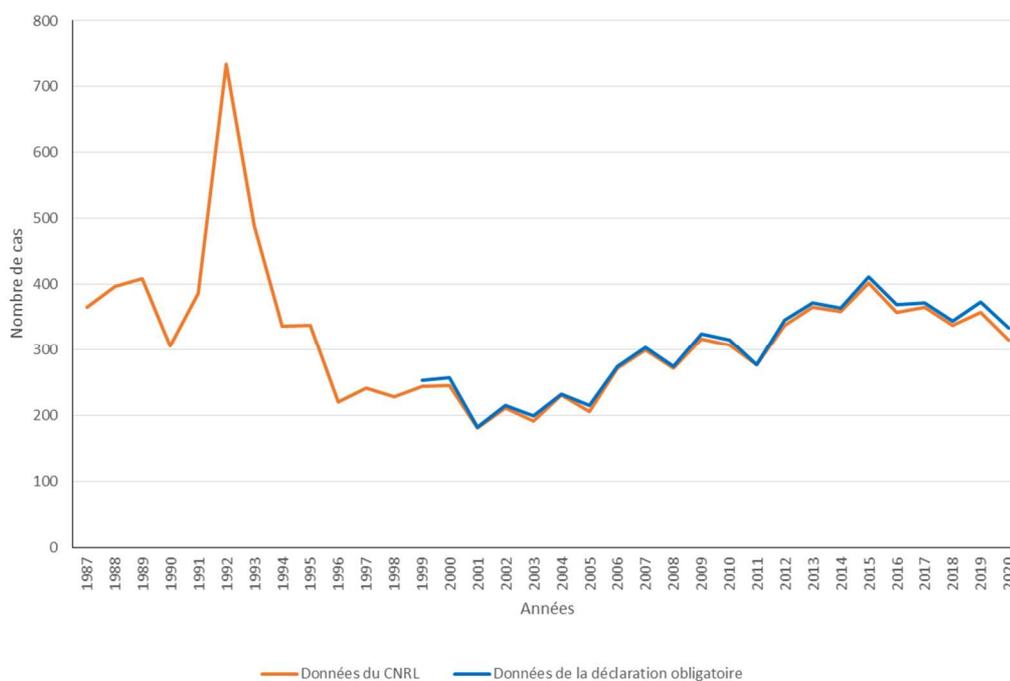
Pour 2020, le CNRL retient donc, après recoupement des données de SPF, 320 cas de listériose à *Listeria monocytogenes* (361 en 2019) au jour du traitement statistique de ce rapport. La différence de 18 cas (2019 : 13) par rapport aux données de SPF est due à des cas sans souche associée à la DO (car non conservées par les laboratoires); des cas diagnostiqués par culture, mais dont la souche envoyée au CNRL n'était pas cultivable et 2 cas (2019 : 1 cas) en Polynésie française et Tahiti (non comptabilisés par SPF). En 2020, en accord avec les données de SPF, il y a donc eu 309 cas (2019 : 352) en France métropolitaine et 11 (2019 : 8) dans les DROM-TOM-COM.

L'incidence de la listériose depuis 1992 en France a suivi l'évolution suivante :

- Diminution importante dans les années 1990 de 700 à environ 200 cas par an.
- Augmentation modérée depuis 2006 entre 300 et 400 cas / an (Figure 4) (10).

L'incidence de la listériose humaine est de 4,6 cas par million d'habitants en 2020 (2019 : 5,3 cas par million d'habitants).

Figure 4. Nombre de cas recensés en France par le CNRL et par la Déclaration Obligatoire (Source : SPF) entre 1987 et 2020



Taux d'exhaustivité

La surveillance de la listériose en France se fonde sur le recoupement de 2 sources complémentaires recensant les cas : la notification aux ARS (Déclaration Obligatoire) et l'envoi volontaire des souches par les microbiologistes au CNRL.

Le taux d'exhaustivité de réception des souches par rapport à l'ensemble des cas recensés est de 95% en 2020 (97% en 2019) résultant de LABM focalisés sur la pandémie SARS-Cov2 et le développement des PCR syndromiques sans isolement de souches (Figure 4). Parmi les systèmes de surveillance européens de la listériose, la France présente l'un des taux d'exhaustivité les plus élevés, rendant possible des analyses épidémiologiques et microbiologiques de qualité, grâce à la participation active des biologistes du territoire national.

NB. Les données de Santé Publique France obtenues par technique de capture / recapture sur les systèmes de surveillance de la listériose et Epibac (surveillance des infections invasives) de 2008 à 2013 a permis d'évaluer l'exhaustivité de la déclaration obligatoire de la listériose en France entre 85 et 87% (11).

Cas de listériose dans les DROM-TOM-COM

En 2020, 11 cas sporadiques de listériose (2019 : 8 cas) ont été identifiés dans les DROM-TOM-COM :

- 1 (2019 : 4) dans l'île de la Réunion, DROM le plus peuplé,
- 2 (2019 : 1, Tahiti) cas en Polynésie française - Tahiti (non comptabilisé par SPF),
- 1 cas en Nouvelle-Calédonie (non comptabilisé par SPF dans le nombre de cas français),
- 4 cas (2019 : 1) en Guadeloupe,
- 2 cas (2019 : 1) en Martinique,
- 1 cas (2019 : 0) à Mayotte.

En 2019, les 3 alertes produits à la Réunion ont permis d'identifier l'origine des clusters 277 et 175 de cas humains. Par contre les 2 alertes en Guyane n'ont pas permis d'identifier de cas liés.

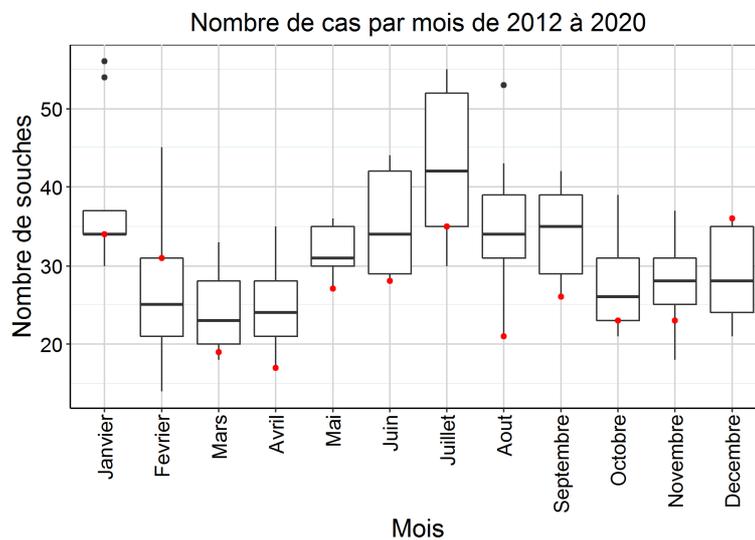
Le CNRL a contribué à une étude avec le Dr COLOT du CH de Nouméa (Nouvelle-Calédonie) sur 20 cas de listérioses.

Distribution temporelle des cas métropolitains

Le nombre mensuel de cas sporadiques observés de 2012 à 2020 est présenté dans la Figure 5.

En 2019 et 2020, les mois où le plus grand nombre des cas ont été notifiés sont Juillet, Décembre et Janvier (Figure 5), reflétant la saisonnalité habituelle des cas en France pour Juillet et pour l'hiver (classiquement Janvier). Les raisons de cette saisonnalité ne sont pas identifiées.

Figure 5. Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine entre 2012 et 2020 (Le point rouge indique le nombre de cas pour 2020)



Distribution géographique

La distribution géographique des cas par département est présentée dans la Figure 6.

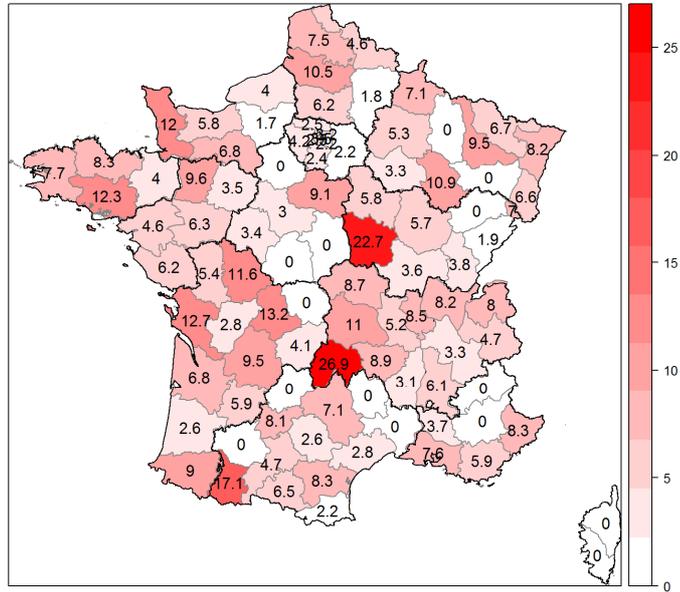
Les chiffres d'incidence sont exprimés en nombres de cas par 10⁶ d'habitants par département et ont été calculés à partir des données démographiques établies par l'INSEE.

En 2020, l'incidence de la listériose était la plus élevée dans les départements des Hautes-Pyrénées, de la Creuse, du Cantal et de la Sarthe (2019 : Nièvre, Cantal et Hautes-Pyrénées) (Figure 6A). On note entre 2012-2019 une incidence de listériose légèrement plus élevée dans la moitié Ouest et Sud-Ouest de la France (Figure 6B).

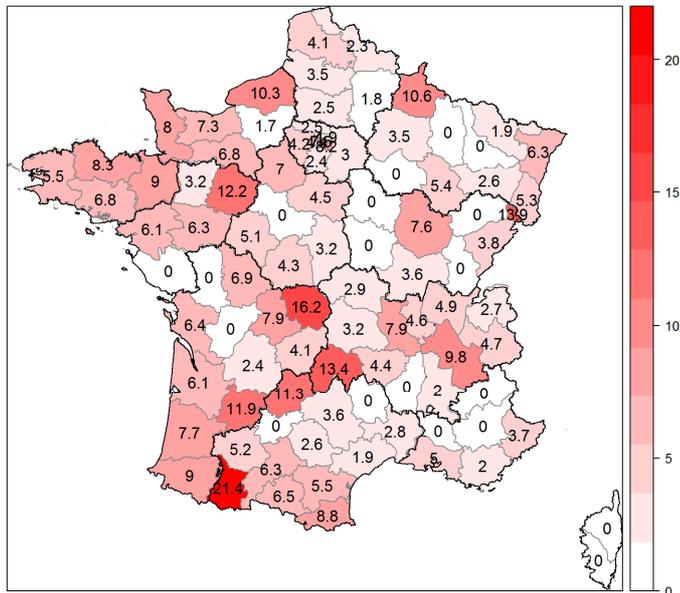
Figure 6. Incidences départementales des cas de listériose en 2019 et 2020 (A) et de 2012 à 2020 (B) (Incidence par 10⁶ d'habitants par département). En surligné noir, le découpage des nouvelles régions françaises

A

**Incidence moyenne par département en 2019
(par million d'habitants)**

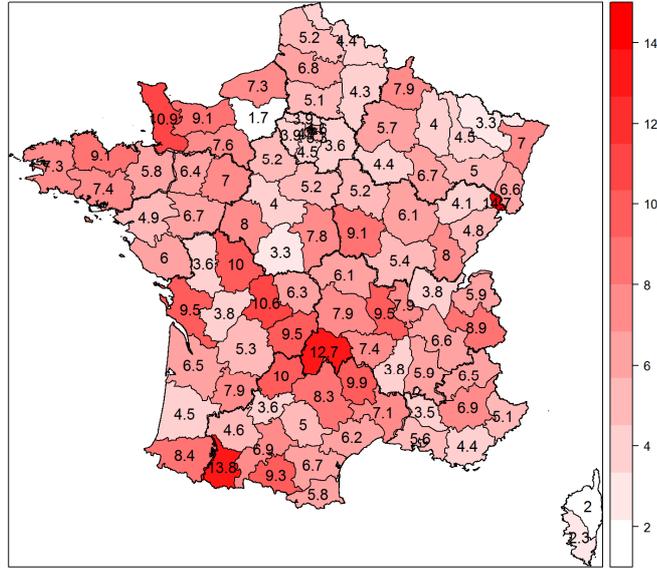


**Incidence moyenne par département en 2020
(par million d'habitants)**



B

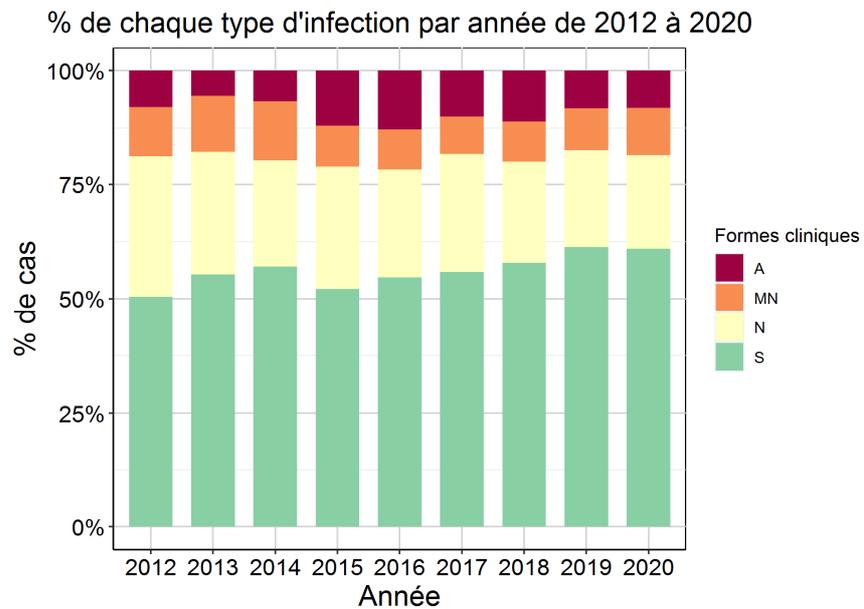
Incidence moyenne par département en 2012 - 2020
(par million d'habitants)



Analyse par forme clinique

La distribution des types d'infection est stable depuis 2012, avec une prédominance des formes septicémiques (62% en 2019 et 2020), puis neurologiques, et enfin des formes materno-néonatales et des autres formes invasives (Figure 7).

Figure 7. Distribution des cas sporadiques de listériose survenus en France métropolitaine depuis 2012 par forme clinique et par année.



Formes materno-néonatales

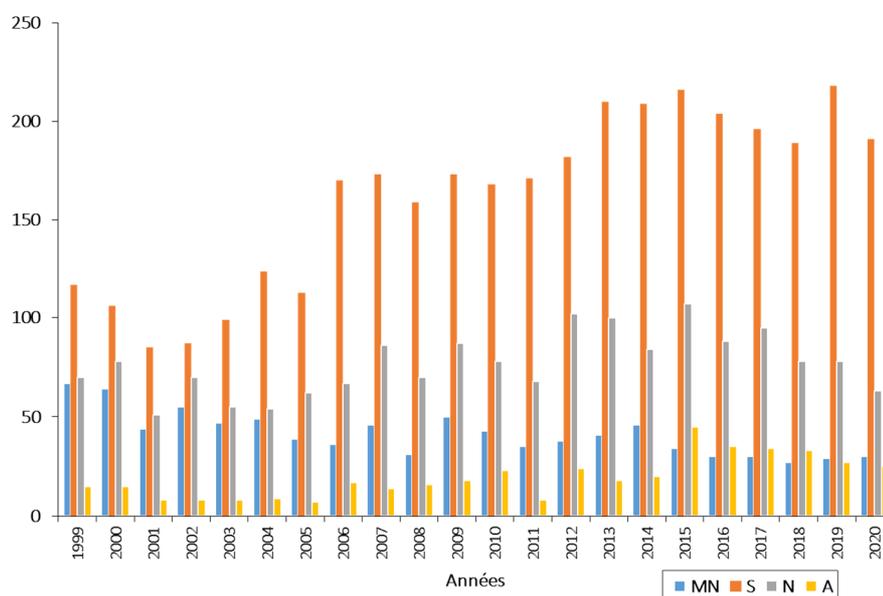
En 2020, 30 formes MN ont été enregistrées (2019 : 29), représentant 8,8 % du nombre total de cas (2019 : 8,2%). Depuis 2016, la proportion de formes MN semble se stabiliser. En 2020, l'incidence des formes MN était de 4,07 pour 100.000 naissances vivantes (2019 : 3,85), l'une des plus faibles enregistrées depuis 2006. Le nombre de cas MN a diminué de 51% entre 1999 et 2008, puis s'est stabilisé depuis autour de 30 à 40 cas par an (représentant 8 à 15% du total des cas ; Figure 8). Cette diminution est consécutive et donc possiblement la conséquence des campagnes de recommandations alimentaires destinées aux femmes enceintes. Il est à noter une baisse de la natalité en 2020.

L'étude prospective MONALISA a mis en évidence une incidence plus élevée de listériose MN au sein des populations originaires d'Afrique subsaharienne et du Maghreb (33% des patientes versus 11% des femmes enceintes en France, selon les données INSEE de la même période) (12). Les raisons n'en sont pas connues [Situation socio-économique défavorisée, comme en Grande-Bretagne (13) ? et/ou consommation accrue d'aliments à risque, comme chez les femmes enceintes d'origine mexicaine aux USA (14) ?]. **Ceci pourrait justifier des actions ciblées vers ces populations pour améliorer encore la prévention de la listériose.**

Formes non materno-néonatales

En 2020, 279 formes non materno-néonatales ont été enregistrées (2019 : 323), soit 90,3 % (2019 : 89%) du total des cas sporadiques comme depuis 2016. Elles se répartissent en 191 (209 : 218) formes septicémiques, 63 (2019 : 78 formes) neurologiques et 25 (2019 : 27) autres formes. La Figure 8 indique leur répartition.

Figure 8. Évolution de la répartition des formes cliniques par année, depuis 1999



Le Tableau 2 décrit la répartition des infections invasives classées comme « autres formes » de 2012 à 2020.

Les infections ostéo-articulaires, biliaires, urinaires, oculaires, pleuro-pulmonaires, endovasculaires et cutanées ont fait l'objet d'analyses spécifiques dont les résultats ont été publiés (15-22). Des travaux sont en cours concernant les infections ganglionnaires et les infections de liquides d'ascite.

Tableau 2. Répartition des autres formes de listériose de 2012 à 2020

Autres formes	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Vasculaire	1	1	1	2	3	4	1	4	1	18
Adénopathie	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3
Endocardite	0	1	2	2	3	0	3	0	0	11
Os/articulaire	5	6	8	18	12	4	9	7	6	75
Digestive	3	1	1	3	1	0	4	0	2	15
Foie	0	0	0	2	1	1	1	1	1	7
Œdème	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Érysipèle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infection d'ascite	12	7	4	9	8	15	6	7	10	78
Infection urinaire	2	0	0	0	1	0	1	0	2	6
Pneumopathie	3	1	3	3	3	2	2	1	1	19
Prostatite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infection oculaire	0	0	0	3	0	1	1	1	2	8
Infection cutanée	0	0	0	3	2	2	2	0	0	9
Abcès	0	0	0	0	1	2	0	0	0	3
Fièvre/Céphalées	0	0	0	0	1	1	1	4	0	7
Lymphome	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
Total	27	18	20	45	36	32	32	26	25	261

Terrain des formes non materno-néonatales. Des renseignements cliniques transmis par le biologiste accompagnent chaque souche à leur réception au CNRL. Ces données étaient renseignées dans 90% des cas en 2020 (2019 : 92%), un chiffre stable depuis 2015. Dans 53% des cas renseignés en 2020 (2019 : 51%), une ou plusieurs pathologies sous-jacentes étaient rapportées : cancer, cirrhose, éthylisme, diabète, dialyse, infection par le VIH, transplantation d'organe ou traitement immunosuppresseur (23) (50-56% de 2011 à 2018). Les comorbidités des patients avec listériose ont été analysées en détail dans le cadre de l'étude MONALISA (12).

Âge et répartition par sexe des patients avec listériose non materno-néonatale :

L'âge moyen des patients avec forme non-MN est de 74,5 ans en 2020 (2019 : 74 ans), avec une médiane de 76 ans (0 à 100 ans ; versus 77 ans en 2019 et 62 ans en 1999). Cette tendance pourrait refléter l'allongement de la durée de vie observée dans la population française (<https://www.insee.fr/fr/statistiques/3312958>), mais aussi l'administration de traitements immunosuppresseurs à des patients de plus en plus âgés (Figure 9).

La distribution par classe d'âge des cas non materno-néonataux illustre la rareté de ces cas dans la classe d'âge 1-44 ans (Figure 10).

En 2017 et 2019, parmi les sujets de plus de 60 ans, on notait également une répartition bimodale des cas : patients âgés d'environ 65 ans et d'environ 75 ans, qui n'a pas été observée en 2020. Les données de l'étude observationnelle MONALISA permettent de suggérer que ces patients présentent des caractéristiques différentes : patients âgés avec comorbidités liées à l'âge, et patients moins âgés, mais porteurs de comorbidités immunosuppressives (2).

Figure 9. Données cliniques associées aux souches réceptionnées de 2012 à 2020 (formes cliniques et l'âge du patient). En rouge, les cas de 2020

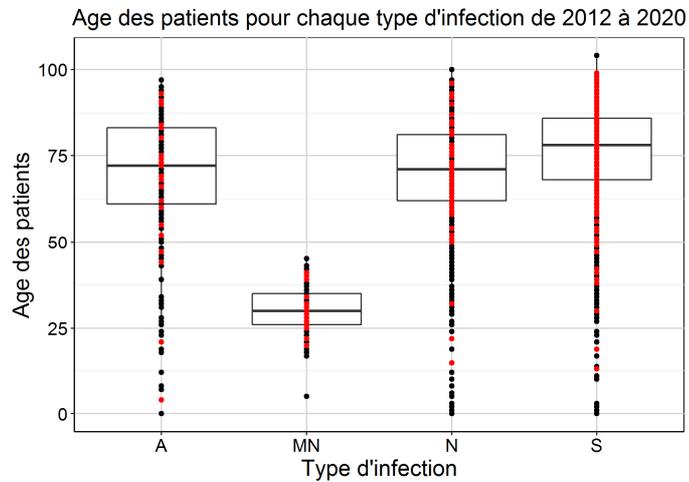
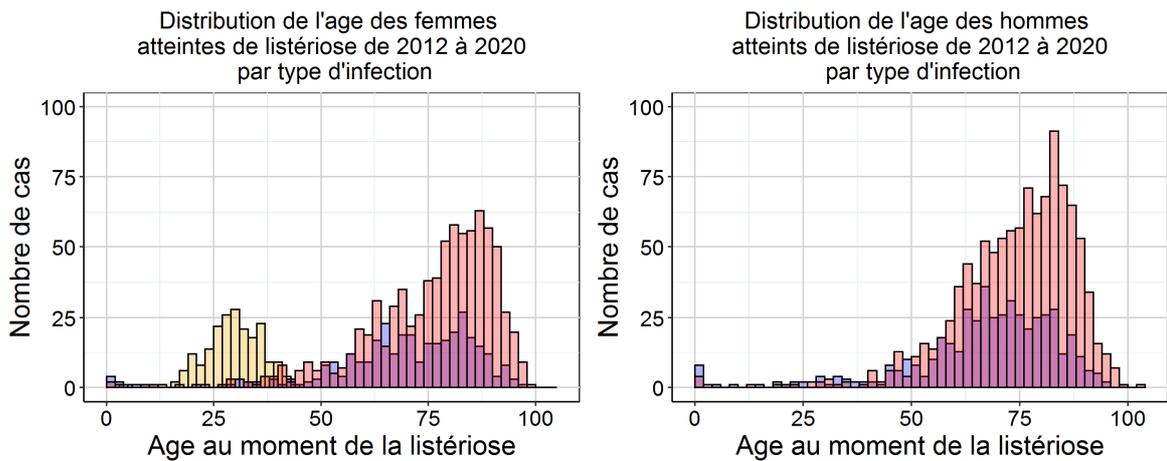
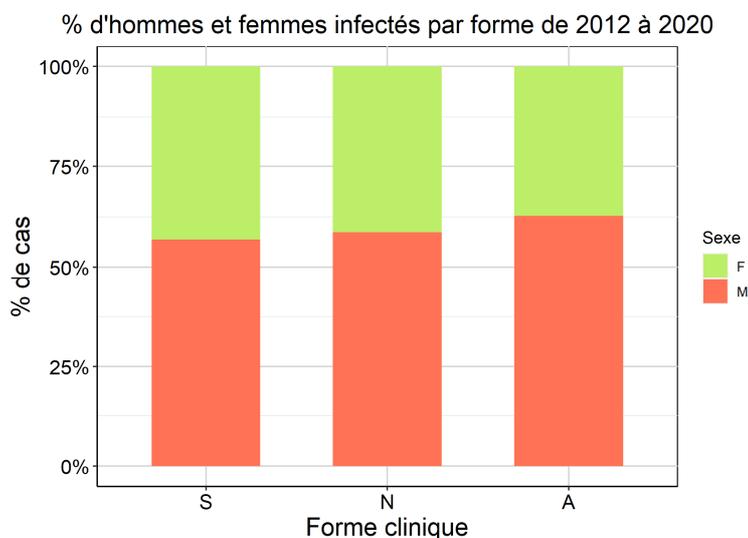


Figure 10. Distribution de l'âge des patients atteints de listériose entre 2012 et 2020 selon le sexe et le type d'infection. En jaune, les formes materno-néonatales. En rouge, les septicémies. En bleu, les formes neuroméningées. En violet, la superposition entre les formes septicémiques et des formes neuroméningées



La distribution par sexe montre un excès significatif d'hommes par rapport au sex-ratio attendu dans cette classe d'âge (Figure 11). Le sex-ratio M/F était ainsi de 1,46 en 2020 (2019 :1,4) comme depuis 2016 (avec 59 % d'hommes (2011-2019 : 59%)). Cette prédominance masculine des formes non-MN est constatée dans d'autres pays occidentaux (14, 24), et reste inexplicée (différences d'exposition alimentaire ? Prédisposition génétique liée au sexe ? Plus grand nombre de comorbidités immunosuppressives ?).

Figure 11. Répartition du sexe selon les formes cliniques S, N et A de 2012 à 2020



3.2.3. Analyse microbiologique

Analyse par groupe PCR

Analyse générale

Les distributions par groupe PCR et par année des souches d'origine humaine isolées de 2012 à 2020 en France métropolitaine sont présentées dans le Tableau 3 et Figure 12.

Le groupe PCR majoritaire des souches humaines isolées était le groupe PCR IVb comme en 2019. Il représente 60% (2019 : 56%) des souches, suivi du groupe PCR IIa (31% ; 2019 : 34%), IIb (7% ; 2019 : 9%) et IIc (2% ; 2019 : 3%). Depuis 2006, cette distribution est stable, et diffère de celle observée pour les souches alimentaires, pour lesquelles le groupe PCR IIa est majoritaire (60% contre 2019 : 55%) (Figure 12).

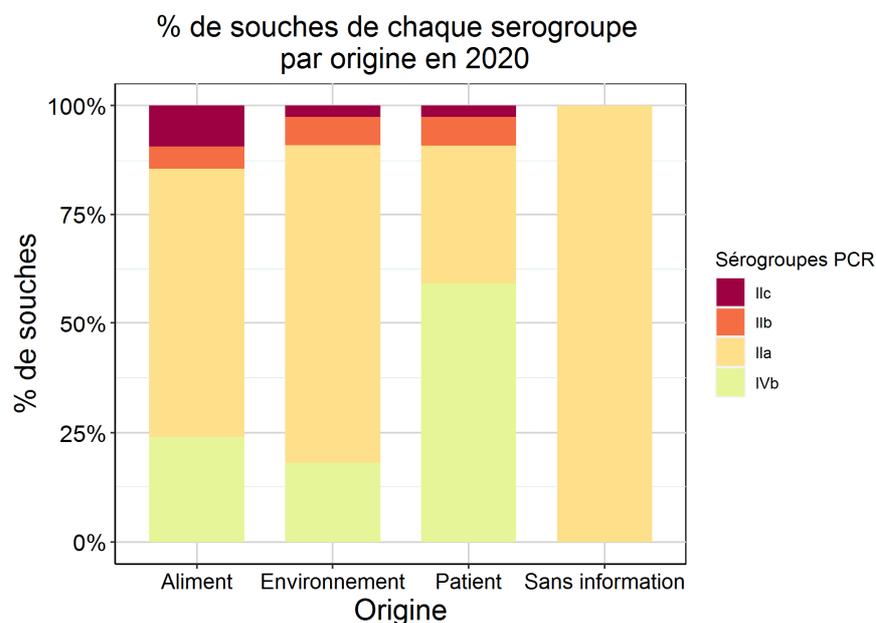
Une souche d'origine humaine de bactériémie appartenant au variant v1 du groupe PCR IVb a été identifiée en France en 2019. Une souche de ce variant IVb-v1 (25) a été identifiée dans des aliments en 2019, mais non en 2020 (8, 9).

La distribution mensuelle et par provenance des principaux groupes PCR ne met pas en évidence de saisonnalité ou de disparité géographique.

Tableau 3. Répartition des groupes PCR par année depuis 2012

Groupe PCR	Souches du sérovar	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
IIa	1/2a ou 3a	98 (29%)	135 (37%)	137 (38%)	129 (32%)	126 (35%)	138 (39%)	104 (32%)	119 (34%)	96 (31%)
IIb	1/2b, 3b ou 7	43 (13%)	32 (9%)	39 (11%)	65 (16%)	45 (13%)	42 (12%)	32 (10%)	28 (8%)	21 (7%)
IIc	1/2c ou 3c	12 (3%)	12 (3%)	9 (3%)	10 (3%)	9 (3%)	6 (2%)	12 (4%)	9 (3%)	7 (2%)
IVb (+IVb-v1)	4b, 4d ou 4e	185 (55%)	182+2 (51%)	172+2 (48%)	198 (49%)	176+1 (49%)	166+1 (47%)	177 (54%)	195+1 (56%)	185 (60%)
L	4ab ou 4c ou 4a	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)
Total		338	363	359	402	357	353	326	352	309

Figure 12. Répartition des sérogroupes PCR par origine



Distribution des groupes PCR selon la forme clinique

Les souches des groupes PCR IVb et IIa sont les plus fréquentes parmi les isolats cliniques, quel que soit le type d'infection (Tableau 4 et Figure 13). Le géosérotype IVb est impliqué dans 60% des listérioses (2019 : 56%), et dans 70% (2019 : 83%) des formes MN et 73% (2019 : 67%) des formes N (Tableau 4). Le groupe PCR IIc n'est que très rarement responsable de listérioses humaines, en particulier pour les formes materno-néonatales (0 cas en 2019 et 2020) et neurologiques. La grande majorité des souches PCR expriment une internaline (InIA) tronquée (26-28). Il n'y a pas de corrélation entre l'âge du patient et le groupe PCR.

Tableau 4. Répartition des groupes PCR des souches selon les formes cliniques en 2019-2020

	Materno-néonatale		Septicémie		Infections du système nerveux central		Autres formes		Total	
	2019	2020	2019	2020	2019	2020	2019	2020	2019	2020
IIa	3	10	88	64	18	13	10	9	119 (34%)	96 (31%)
IIb	2	4	18	14	5	3	3	0	28 (8%)	21 (7%)
IIc	0	0	5	5	3	1	1	1	9 (3%)	7 (2%)
IVb (+ IVbv1)	24	16	106 +1	108	52	46	13	15	196 (56%)	185 (60%)
L	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0%)	0 (0%)
Total	29	30	218	191	78	63	27	25	352	309

Analyse MLST

Depuis 2015, le CNRL détermine le ST (cgMLST) et CC (MLST) de ces souches par une extraction *in silico* de profils alléliques de la séquence génomique (annexe B). Ceci permet d'étudier la prévalence et la distribution des CC dans les échantillons cliniques et alimentaires, en complément des données de MLST des souches typées depuis 2005 et avant l'ère du séquençage systématique (28).

Aspect général

La prévalence et la distribution des clones MLST dans les échantillons cliniques et alimentaires ont été étudiées sur 6633 isolats collectés de manière exhaustive par le CNRL entre 2005 et 2013 (28).

Cette étude a démontré l'existence de 12 clones MLST majeurs chez *Lm*, qui représentent près de 80% des souches cliniques et alimentaires (Figure 13). En France, les clones CC1, CC2, CC4 et CC6 sont significativement plus fréquemment identifiés dans des échantillons cliniques que dans des échantillons alimentaires, alors que les clones CC9 et CC121 sont significativement associés à une origine alimentaire. Le complexe clonal CC1 est essentiellement associé aux formes neurologiques, les clones CC1, CC2 et CC4 aux formes materno-néonatales et les clones CC8+CC16, CC9 ainsi que CC121 aux formes septicémiques. Cette étude, en utilisant certaines données de l'étude MONALISA, a également montré que les clones CC1, CC2, CC4 et CC6 infectent des individus faiblement ou non immunodéprimés plus facilement que les autres clones, alors que les clones CC9 et CC121 sont plus souvent isolés de patients très immunodéprimés. L'ensemble de ces résultats, combinés à des tests de virulence *in vivo*, a permis de montrer que les clones CC1, CC2, CC4 et CC6 sont hypervirulents, alors que les clones CC9 et CC121 sont hypovirulents (28).

Cette étude a été complétée en 2019 par une étude de la prévalence et la distribution des CC dans les différentes catégories d'aliments (Figure 14), avec l'étude de 3333 isolats alimentaires réceptionnés au CNRL de 2005 à 2016 (29) en comparaison de 3308 isolats d'origine humaine pour la même période d'étude.

Elle a montré que les clones hypervirulents de *Lm* (CC1, CC4 et CC6), particulièrement CC1, étaient fortement associés aux produits laitiers alors que les clones hypovirulents CC9 et CC121 étaient associés aux produits carnés. L'adaptation à des niches écologiques distinctes et/ou à différentes voies de contamination des produits alimentaires peut expliquer cette répartition inégale. En effet, les clones hypervirulents colonisent expérimentalement mieux la lumière intestinale et envahissent plus le tissu intestinal que les hypovirulents, ce qui suggère une meilleure adaptation à l'hôte, dont les bovins, ovins et caprins à l'origine des produits laitiers. À l'inverse, les clones hypovirulents sont adaptés aux environnements de transformation des aliments, avec une prévalence plus élevée de gènes de résistance au stress et de tolérance au chlorure de benzalkonium et une capacité de survie et de formation de biofilm plus élevée en présence de concentrations sublétales de chlorure de benzalkonium dans lequel il évolue. Les gènes potentiellement impliqués dans l'adaptation à l'hôte ou à un mode de vie saprophyte ont été identifiés dans cette étude en utilisant une approche de GWAS (Genome-Wide Association Study).

Figure 13. Prévalence et distribution des clones MLST de *Lm* dans les sources clinique et alimentaire d'isolement (Source : Maury, Tsai *et al.*, Nature Genetics 2016). Seuls les clones avec plus de 10 isolats sont représentés. (a) Prévalence des clones MLST de *Lm*. La courbe représente le pourcentage cumulatif d'isolats des différents clones, les clones étant ordonnés par nombre d'isolats et (b) Fréquence des clones au sein des isolats alimentaires (axe des X) et les isolats cliniques (axe des Y). La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'isolats. Les positions des souches de référence sont indiquées.

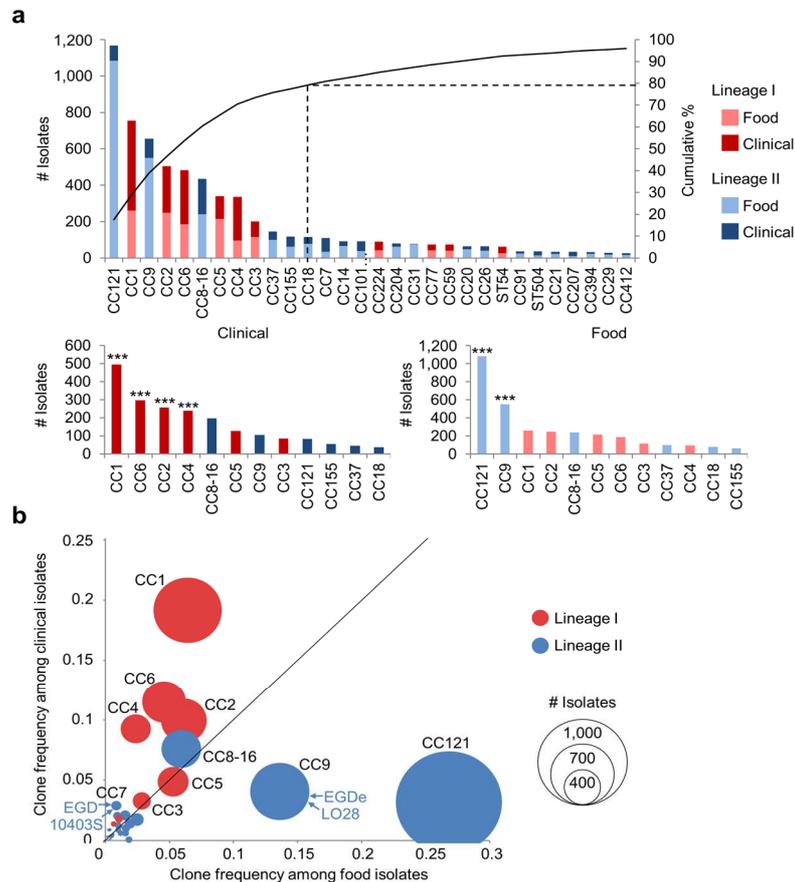
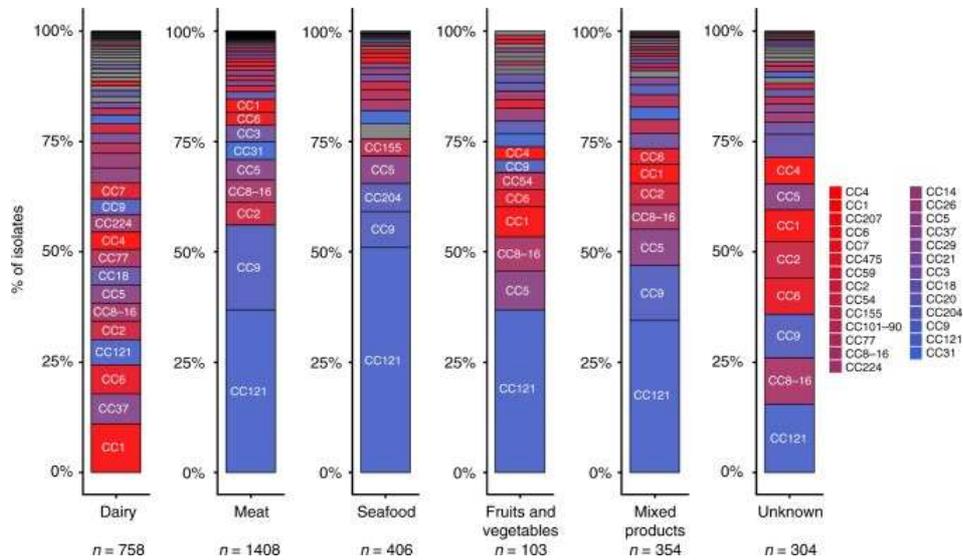


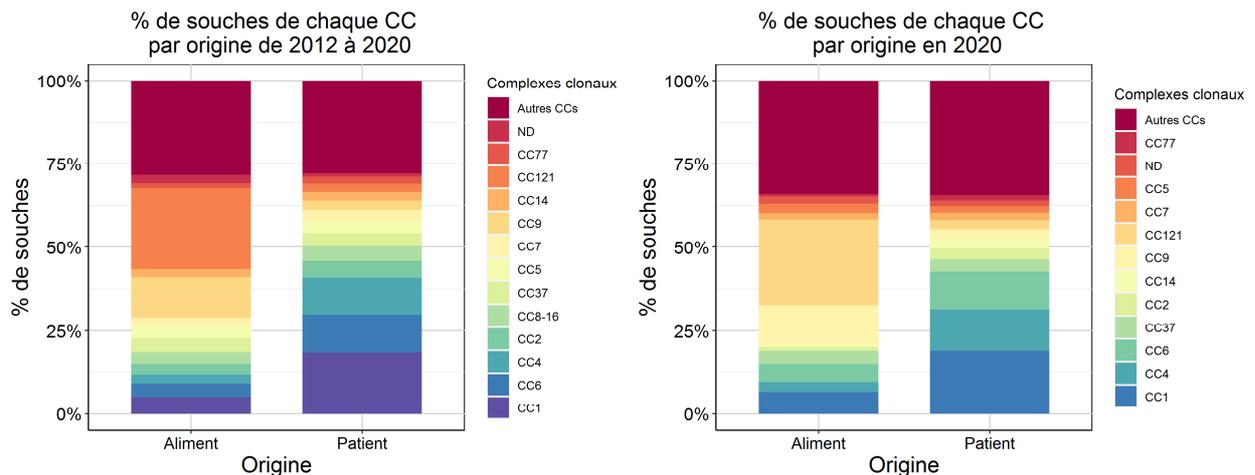
Figure 14. Prévalence et distribution des clones MLST de *Lm* dans différentes catégories d'aliments (Source : Maury *et al.*, Nature Communications 2019). Le pourcentage d'isolats de chaque CC par type d'aliment (produits laitiers, produits carnés, fruits de mer, fruits et légumes, produits mixtes et types d'aliments inconnus) est représenté. Les autres CC, considérés comme mineurs, sont représentés en gris. Les clones pertinents pour l'interprétation sont indiqués sur les graphiques. Le nombre d'isolats de chaque type d'aliment est indiqué sous les graphiques ($N=3333$ isolats alimentaires, France 2005-2016).



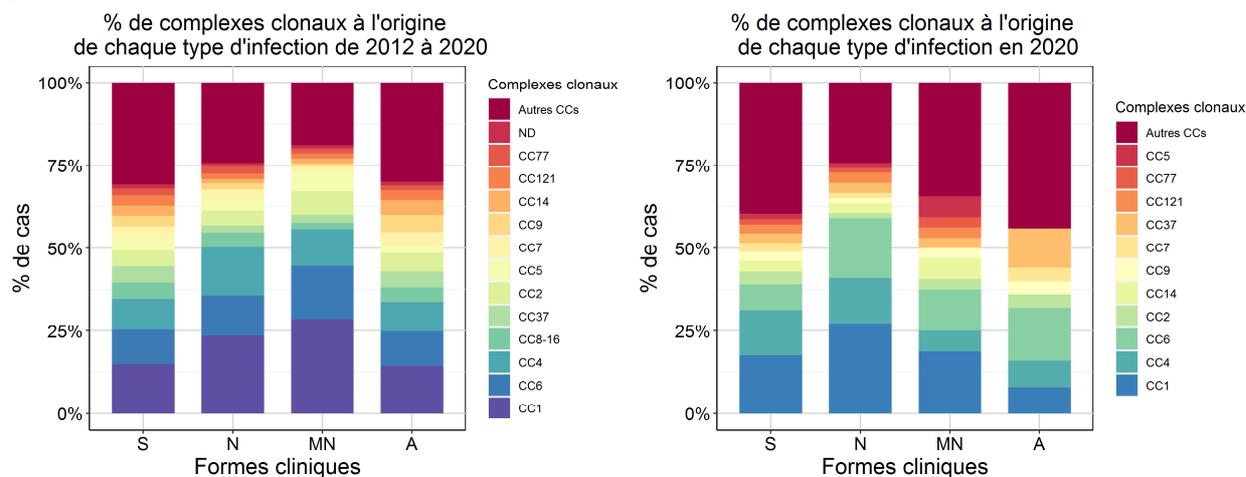
La Figure 15 montre la distribution, par formes cliniques, des différents clones des isolats cliniques collectés de 2012 à 2020. Elle montre une grande diversité des clones impliqués dans les infections cliniques, avec la prédominance des clones hypervirulents (CC1, 2, 4 et 6) dans les infections neurologiques et materno-néonatales (28).

Figure 15. Distribution des clones MLST par origines et types d'infection pour les isolats collectés de 2012 à 2020. (A) Distribution par origines. (B) Distribution par types d'infection. Les clones les plus fréquents sont représentés

A



B



Analyse génomique par cgMLST

Cette analyse réalisée par le CNRL et SPF se trouve au point 4.2. de ce rapport.

3.3. CARACTERISATION DES SOUCHES D'ORIGINE NON HUMAINE REÇUES AU CNRL

Les souches isolées lors de contrôles sanitaires officiels ou d'autocontrôles (dépassements du critère microbiologique de sécurité déclenchant une alerte produit auprès de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) en fonction du type d'aliment concerné, et d'investigations autour de cas humain) sont systématiquement adressées au CNRL. Chaque professionnel de l'industrie agroalimentaire (laboratoires privés ou publics) peut également, dans le cadre d'autocontrôles, envoyer ses souches pour caractérisation au CNRL. Le CNRL reçoit également les souches des plans annuels de surveillance et de contrôle de *Lm* conduits par la DGAI, afin d'estimer le niveau de contamination d'aliments de différentes filières. Le CNRL reçoit enfin des souches alimentaires dans le cadre de contre-expertises diligentées par les assureurs pour confirmation de résultats de caractérisation.

En 2019, la loi États généraux de l'Alimentation (EGALIM) par son article 50 a renforcé la déclaration des alertes-produits (résultats d'autocontrôles défavorables) et les sanctions encourues par les exploitants du secteur agroalimentaire. Cet article 50 couvre tous les produits (sous la responsabilité de l'exploitant du secteur alimentaire ou sur le marché), mais ne modifie pas la procédure de gestion des alertes des produits mis sur le marché et ne prévoit pas de nouvelle disposition sur la gestion de la maîtrise des risques sanitaires par l'exploitant. Dans ce cadre, l'instruction-technique DGAI/SDSSA/2019-555 parue le 30 Juillet 2019 introduit une nouveauté avec le signalement en cas d'analyses défavorables sur les produits sous la responsabilité de l'exploitant uniquement (avant mise sur le marché) ou sur l'environnement de production selon les cas.

La DGAI a rappelé en 2020, par un document établi avec le CNRL adressées aux DDPP le cheminement des souches dans le cadre des investigations et des alertes-produits. Les souches d'autocontrôles défavorables devraient avoir une nomenclature spécifique et une demande d'analyses en cgMLST plus qu'en géosérogroupe comme le demande fréquemment l'opérateur agro-alimentaire, ce qui ne lui permet pas de détecter la persistance éventuelle d'une souche d'atelier.

Une souche d'origine animale (vétérinaire) a été transmise au CNRL en 2019 dans le contexte d'une otite de chien avec une *L. monocytogenes* CC9. Plus généralement, l'étude des souches vétérinaires serait intéressante, afin de mieux comprendre les chaînes de transmission de cette bactérie de l'animal à l'homme.

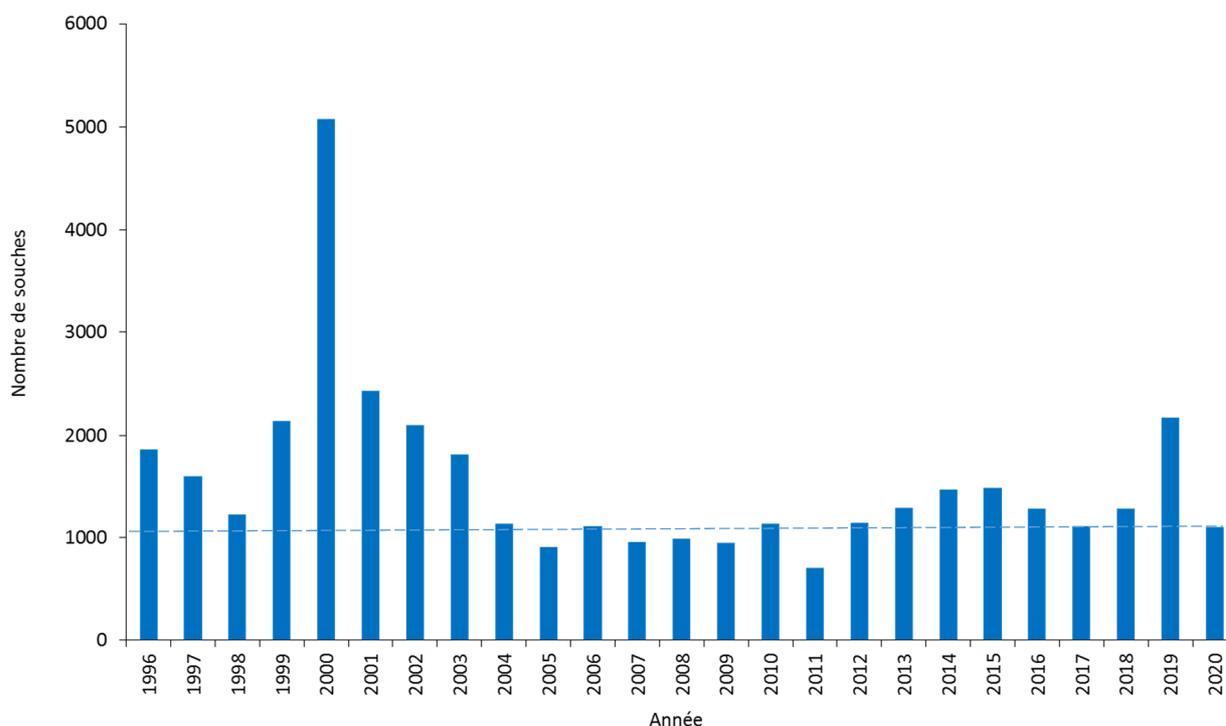
Analyse générale

Cette activité consiste à caractériser les souches isolées d'aliments ou de l'environnement agroalimentaire envoyées au CNRL pour :

- participer au plan de maîtrise des opérateurs agroalimentaires concernant *Listeria monocytogenes* en confirmant les résultats des autocontrôles et en caractérisant les souches,
- participer à l'identification du véhicule alimentaire en cas de cluster cgMLST, de cas groupés ou en début d'épidémie,
- comparer les souches cliniques aux souches alimentaires et identifier leurs caractéristiques respectives,
- constituer une banque de données pour mener les investigations lors de clusters de cas humains ou en début d'épidémie.

En 2020, 1100 souches (2019 : 2173) de cette catégorie ont été reçues de France métropolitaine (baisse de 49% par rapport à 2019 alors qu'il y avait en 2019 une augmentation de 37% par rapport à 2018 (n = 1581)) (Figure 16).

Figure 16. Nombre annuel de souches d'origine non humaine adressées au CNRL par des laboratoires français depuis 1996.



- Les laboratoires expéditeurs

La répartition des 2173 et 1100 souches non humaines reçues au CNRL en 2019 et 2020 respectivement, par catégories de laboratoires expéditeurs, a montré une diminution du nombre de souches envoyées par les Laboratoires Vétérinaires Départementaux au profit des laboratoires privés, et est la suivante :

- | | |
|---|---------------------------------------|
| • Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : | 176 souches (16%) [2019 : 498 ; 23%] |
| • Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : | 853 souches (77%) [2019 : 1595 ; 73%] |
| • Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : | 18 souches (2%) [2019 : 5 ; <1%] |
| • Laboratoires ANSES hors LNRI : | 53 souches (5%) [2019 : 73 ; 3%] |
| • Laboratoires d'Hygiène de Centres Hospitaliers : | 0 souche (0%) [2019 : 2 ; <1%] |
| • Laboratoires de recherche : | 0 souche (0%) [2019 : 0 ; 0%] |

- L'origine des souches

La répartition par origine des souches non humaines reçues en 2019 et 2020 était la suivante :

- Souches isolées d'aliments : 809 souches (73%) [2019 : 1555 ; 72%]
- Souches isolées de l'environnement agroalimentaire : 289 souches (26%) [2019 : 616 ; 28%]
- Souches autocontrôles sans information : 1 souche (<1%) [2019 : 1 ; <1%]
- Souches isolées chez l'animal : 0 souche (0%) [2019 : 1 ; <1%]
- Souche de recherche : 1 souche (<1%) [2019 : 0 ; 0%]

Les proportions respectives des origines des souches non humaines sont relativement stables depuis 2006.

- Remarques

98% des souches reçues en 2020 appartenait à l'espèce *Lm* (97% en 2019), qui est la seule mentionnée dans les réglementations de sécurité sanitaire des aliments et de l'environnement agroalimentaire. Certains laboratoires, à la demande de leurs clients, envoient pour confirmation des souches d'autres espèces de *Listeria* dans le cadre de la surveillance de *Listeria* spp. dans l'environnement des ateliers de production et de leur plan de maîtrise sanitaire (30) et suite à la parution de l'instruction technique DGAL/SDSSA/2019-555.

Le taux de réception de cultures non pures, contaminées par d'autres espèces bactériennes et rapidement détecté à l'isolement par l'identification Maldi-Tof MS, a été plus faible en 2020 autour de 11% qu'en 2019 (24%). Les cultures non pures entraînent un surcout analytique, allongent le délai d'analyse et peuvent entraîner un retard dans les investigations épidémiologiques.

Souches isolées d'aliments

- Catégories de laboratoires ayant adressé les souches

La répartition des 1555 et 809 souches isolées d'aliments reçues au CNRL en 2019 et 2020 respectivement pour les différentes catégories de laboratoires expéditeurs était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 124 (15%) [2019 : 274 ; 18%]
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 662 (82%) [2019 : 1258 ; 81%]
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 18 (2%) [2019 : 5 ; <1%]
- Laboratoires ANSES dont LNRI : 5 (1%) [2019 : 16 ; 1%]
- Laboratoires d'hygiène de Centres Hospitaliers : 0 (0%) [2019 : 2 ; <1%]

En 2020, le nombre de souches isolées d'aliments reçues au CNRL a baissé de 48% par rapport à 2019 (2019 : +30% par rapport à 2018). Parmi elles et comme en 2018 et 2019, aucune souche ne provenait d'un échantillon prélevé dans le cadre d'un plan de surveillance ou de contrôle géré par la DGAL et le LNRI, mais confié par la DGAL au CNRL pour intégration dans la surveillance nationale et aucune souche n'a été envoyée au CNRL par le LNRI dans le cadre d'investigation de clusters.

- Nombre de souches et distribution par espèce

Sur un total de 809 (2019 :1555) souches d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2019, 790 (98% comme en 2019 et 2018) ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Lm*. Pour 4 envois (2019 :4), les souches n'ont pas pu être analysées : abandon d'analyses (0 contre 2019 : 1), tubes nonensemencés (2 contre 2019 : 1), tubes cassés (1 contre 2019 : 2).

En 2020, une souche (versus 5 en 2018 et 2019) n'appartenait pas au genre *Lm* et ont été identifiés par Maldi-Tof MS et séquençage PCR 16sRNA; il s'agissait en 2019 d'*Enterococcus faecalis* (1 souche), de *Staphylococcus sciuri* (2 souches) et de *Bacillus circulans* (2 souches) et en 2020 de *Bacillus* sp. (1 souche) dont les colonies ont un aspect évocateur de *Listeria* spp. sur milieu Agar selon Ottaviani et Agosti (31).

Le CNRL avait détecté de nombreuses souches contaminées avec *E. faecalis* sur les milieux ALOA/ALOA-Like ce qui a été notifié aux fabricants. Cette bactérie est esculine positive, rhamnose positive et peut avoir une PI-PLC comme *L. monocytogenes*.

La répartition par espèce des 1546 et 809 souches de *Listeria* d'origine alimentaire reçues en 2019 et 2020 respectivement était la suivante :

- *L. monocytogenes* : 790 souches (98%) [2019 : 1515 ; 98%]
- *L. innocua* : 8 souches (1%) [2019 : 19 ; 1%]
- *L. ivanovii* : 1 souche (<1%) [2019 : 0 ; 0%]
- *L. welshimeri* : 1 souche (<1%) [2019 : 11 ; <1%]
- *L. grayi* : 1 souche (<1%) [2019 : 1 ; <1%]

L'identification des espèces est confirmée par l'analyse ANIb (Average Nucleotide Identification) des souches à partir des séquences génomiques et confirmée par le logiciel JSpeciesWGS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#home>).

- Distribution des souches de *L. monocytogenes* par catégorie d'aliments

La répartition par catégories d'aliments des 1526 et 790 souches de *Lm* d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2019 et 2020 respectivement était la suivante :

- Viande et produits carnés : 382 souches (47%) [2019 : 491 ; 32%]
- Lait et produits laitiers : 221 souches (28%) [2019 : 451 ; 30%]
- Produits de la pêche : 64 souches (8%) [2019 : 233 ; 15%]
- Végétaux : 32 souches (4%) [2019 : 43 ; 3%]
- Autres aliments : 85 souches (11%) [2019 : 240 ; 16%]
- Sans information (confidentiel) : 6 souches (2%) [2019 : 57 ; 4%]

La distribution est stable depuis 2011. Les « autres aliments » sont principalement des plats cuisinés et des pâtisseries. Les origines non précisées correspondent à des souches envoyées par des laboratoires privés qui n'ont pas souhaité transmettre cette information.

Le CNRL identifie de manière continue, par le biais de l'analyse de la séquence génomique, la présence de gènes associés à la tolérance aux désinfectants/biocides. Ces composés sont très utilisés par les industries agroalimentaires, en médecine et en cosmétologie pour la désinfection des ateliers, surfaces et équipements. **Cette analyse permet d'orienter ces professionnels, en évitant les molécules auxquelles les souches sont tolérantes.**

- Distribution des souches alimentaires de *Lm* par groupe PCR

La répartition des souches par groupes PCR et par catégories d'aliments est présentée dans le Tableau 5. Le groupe majoritaire est le groupe PCR IIa (sérovars 1/2a, 3a), quelle que soit la catégorie d'aliment, comme depuis 2006. Il est suivi par les groupes PCR IVb et IIc.

Comme l'illustrent la Figure 17 et le Tableau 5, le groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) représente 26% des souches alimentaires analysées en 2019 et 2020, en légère augmentation (18-20% des souches isolées d'aliments de 2011 à 2018), alors qu'il est le groupe le plus fréquemment impliqué en pathologie humaine. En revanche, le groupe IIc, très présent dans les aliments, est très rare en clinique. Ceci suggère une virulence accrue des souches du groupe IVb par rapport aux autres (26, 27, 32-34), ce que nous avons démontré expérimentalement (26, 27, 32-34). Les souches de ce groupe expriment une InIA fonctionnelle (facteur de virulence permettant la traversée des barrières intestinale et placentaire de l'hôte), tandis que celles du groupe IIc expriment en majorité une InIA tronquée et non fonctionnelle (26, 27, 34). Dans un modèle murin humanisé d'infection, les souches du groupe IVb sont plus virulentes (28).

Figure 17. Distribution par groupes PCR des souches de *Lm* cliniques et alimentaires en 2020 et entre 2006 et 2020

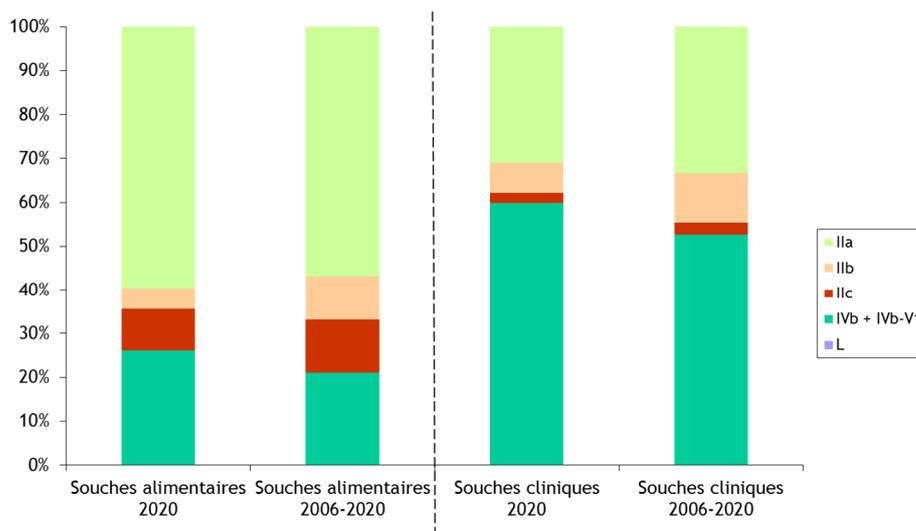


Tableau 5. Distribution par groupes PCR et par catégories d'aliments des souches alimentaires de *Lm* reçues au CNRL en 2019 (en italiques) et 2020

Groupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total	Souches humaines
IIa	256 (259)	96 (173)	42 (204)	14 (36)	62 (132)	1 (30)	471 (60%) [834 (55%)]	96 (31%) [119 (34%)]
IIb	12 (25)	11 (36)	1 (9)	6 (5)	8 (41)	0 (17)	38 (5%) [133 (9%)]	21 (7%) [28 (8%)]
IIc	56 (106)	3 (5)	14 (5)	0 (0)	2 (28)	0 (6)	75 (9%) [150 (10%)]	7 (2%) [9 (3%)]
IVb + IVb-v1	57 (99)	111 (237)	7 (15)	12 (2)	13 (39)	5 (4)	205 (26%) [396 (26%)]	185 (60%) [195+1 (56%)]
L	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (<1%) [2 (<1%)]	0 (0%) [0 (0%)]
Total	382 (491)	451 (221)	64 (233)	32 (43)	85 (240)	6 (57)	790 (1515)	309 (352)

- Distribution des souches alimentaires de *Lm* par complexes clonaux

Une analyse similaire peut être pratiquée par typage MLST (Figure 14). En 2020, certains complexes clonaux, comme CC121 (2019 : 17% ; 2020 : 23%) et CC9 (2019 : 11% ; 2020 : 10%) sont surreprésentés parmi les souches alimentaires et sont hypovirulents (29, 35). À l'inverse, les clones CC1 (2019 : 18% ; 2020 : 19%), CC4 (2019 : 12% ; 2020 : 14%) et CC6 (2019 : 15% ; 2020 : 11%) sont surreprésentés en pathologie humaine, et sont hypervirulents (29, 35).

En 2019, les CCs les plus fréquents dans les aliments étaient, par ordre décroissant, CC121, CC9, CC6, CC37, CC4, et CC1 alors qu'en 2020, il s'agissait du CC121, CC9, CC8, CC1, CC6 et CC37. De 2012 à 2020, CC121, CC9, CC37, CC1 et CC6 étaient les plus représentés.

Souches isolées de l'environnement de production alimentaire industrielle

En 2020, 289 souches (2019 : 616 souches, soit -213%) provenant de l'environnement de production alimentaire ont été reçues au CNRL, adressées par des laboratoires vétérinaires départementaux (n=52, 2019 : 224), des laboratoires privés (n=189, 2019 : 335) ou l'ANSES (LCSSV) (n=48, 2019 : 57). Il s'agit principalement d'échantillons prélevés sur des surfaces dans des industries agroalimentaires (article 5 du règlement européen EC 2073/2005 modifié sur les prélèvements de surface en agroalimentaire et avec le guide complémentaire à la norme EN ISO 18593 (révisée en 2018) et le guide complémentaire sur les prélèvements de surface pour *Lm* : Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Lm*: <https://eurl-listeria.anses.fr/en/system/files/LIS-Cr-201213D1.pdf>) et des suites de signalements dans le cadre de l'instruction technique DGAI/SDSSA/2019-555 ou isolées de réfrigérateurs dans le cadre d'enquêtes alimentaires.

Ces souches appartenaient en 2020 à l'espèce *L. monocytogenes* (n = 284 ; 2019 : n=563), *L. innocua* (n = 4 ; 2019 : n=39), *L. welshimeri* (n=0 ; 2019 : n = 11), *L. grayi* (n=0 ; 2019 : n=1), et 0 (n=2 en 2019) souches non-*Listeria* (*Staphylococcus sciuri* et *Bacillus* spp.). En 2020 ; un tube cassé a été réceptionné.

La répartition par groupe PCR des 563 et 284 souches de *Lm* environnementales isolées respectivement en 2019 et en 2020, est la suivante :

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a): 212 souches (75%) (2019 : 342, 61%)
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7): 22 souches (8%) (2019 : 42, 7%)
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c): 7 souches (2%) (2019 : 50, 9%)
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e): 42 souches (15%) (2019 : 126, 22%)
- groupe PCR L (autres sérovars): 1 souche (<1%) (2019 : 3, <1%)

Les souches des groupes PCR IIa, IIc, et IIb sont majoritaires et représentent 85% (2019 : 77 %) des souches.

En 2019, les CCs les plus fréquents dans l'environnement de production alimentaire étaient, par ordre décroissant, CC121, CC2, CC9, CC155, et CC204 alors qu'en 2020, il s'agissait de CC121, CC101, et CC8. De 2012 à 2020, CC121, CC9, CC5, et CC2 étaient les plus représentés. Les CCs hypovirulents et de virulence intermédiaire (28) sont donc prédominants dans cet environnement de production alimentaire.

Ces données restent peu représentatives des souches de l'environnement en général à cause du faible échantillonnage des souches hors production alimentaire. L'isolement de souches à partir d'environnements naturels (tels que le sol, l'eau, la boue) serait important pour comprendre la circulation des souches entre cet environnement, les aliments et l'hôte humain, et pour déterminer la nature des réservoirs de *Listeria*.

3.4. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX

Toutes les souches d'origine clinique identifiées présentent une résistance naturelle *in vitro* aux céphalosporines de 3^e génération, comme le céfotaxime, à la clindamycine, à la fosfomycine, aux sulfonamides et à l'acide nalidixique.

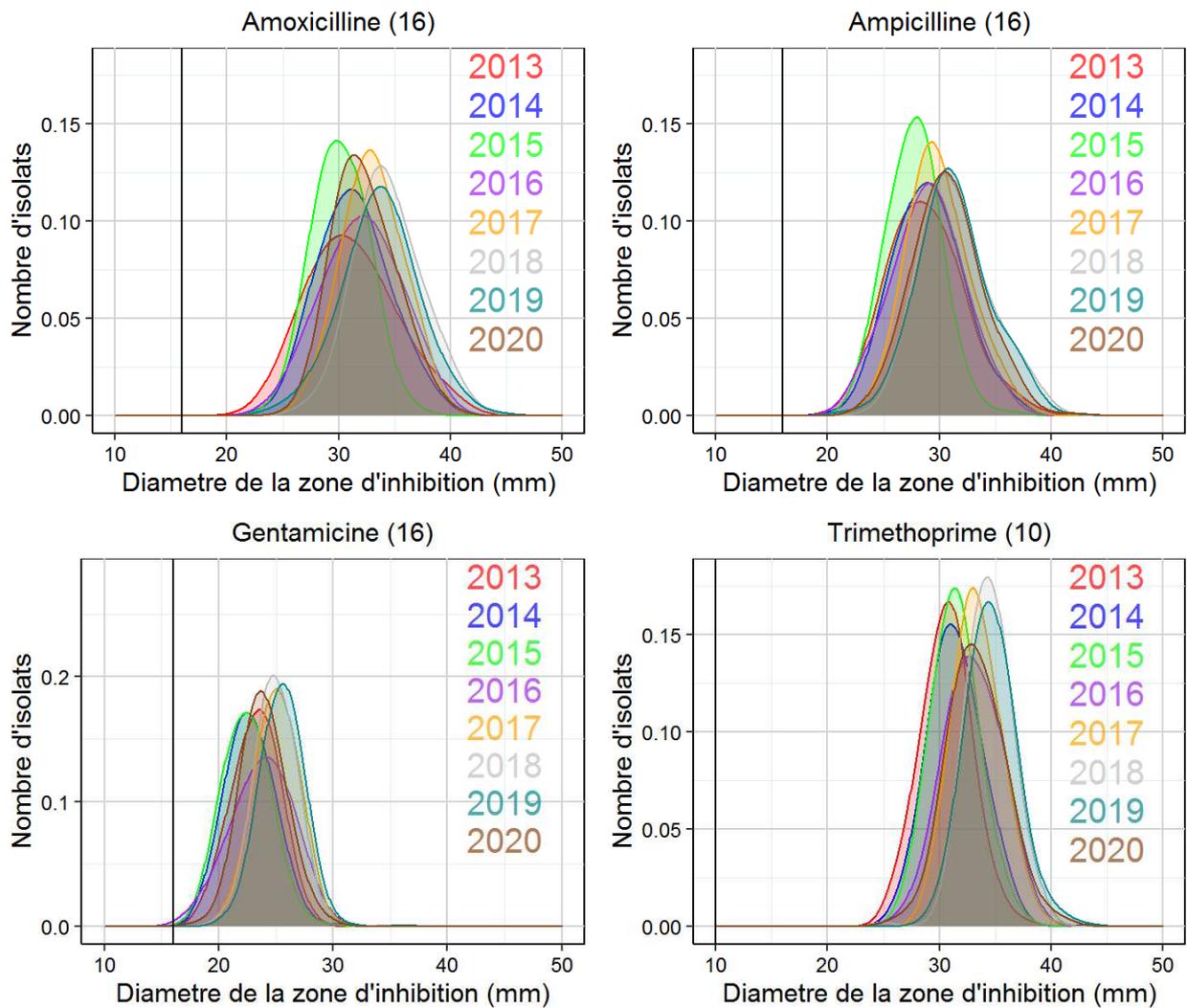
Depuis 2001, toutes les souches humaines reçues au CNRL étaient sensibles à l'ampicilline, à l'amoxicilline, à la gentamicine (Figure 18), à l'imipénème, à l'acide fusidique, à la pénicilline et au chloramphénicol (36).

En 2019-2020, aucune résistance à l'ampicilline, à l'amoxicilline ou à la gentamicine, l'érythromycine, à la tétracycline, à la moxifloxacine, à la lévofloxacine, à la vancomycine, à la ciprofloxacine, à la rifampicine, au triméthoprime, à la kanamycine et la streptomycine n'a été observée sur les souches cliniques. Une résistance (contact) à la tétracycline pour une souche humaine a été identifiée (4 souches en 2020 ; 1 souche en 2019) associée à la présence du gène de résistance *tetM*. Aucune association entre les complexes clonaux MLST et les résistances n'a été observée.

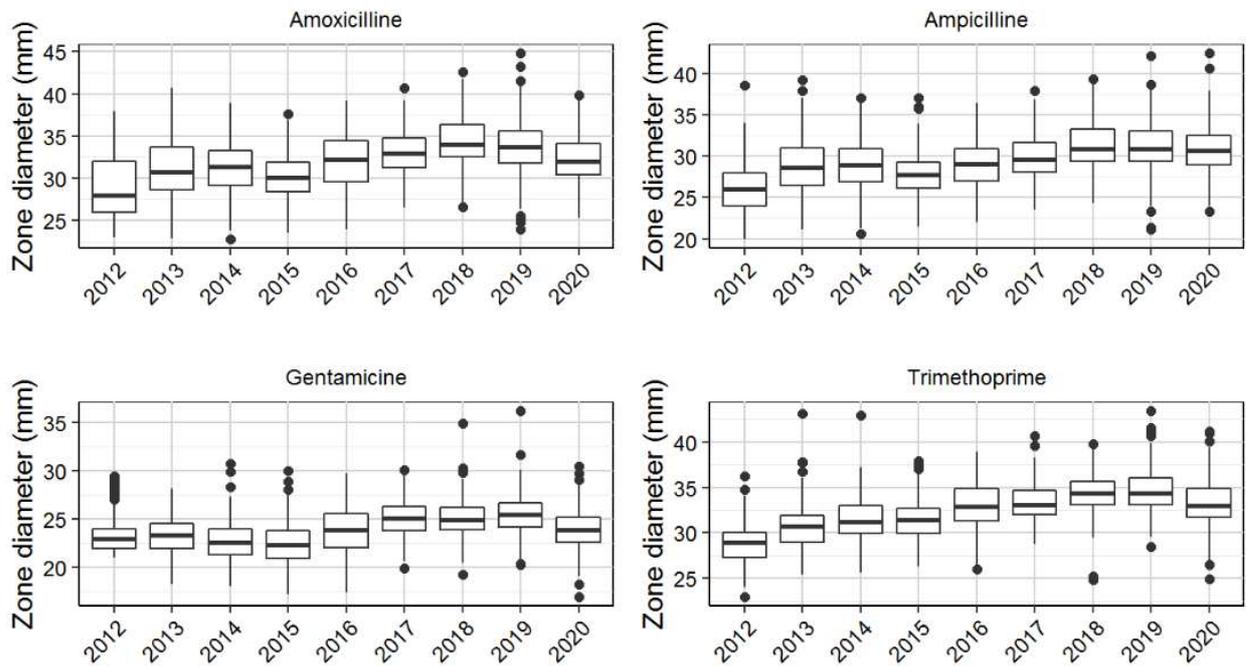
L'analyse des génomes des souches alimentaires et environnementales a mis en évidence la présence des gènes suivants: *aacA4*, impliqué dans la résistance à l'amikacine et tobramycine (2020 : 14 souches, 2019 : 23 souches); *aadE*, impliqué dans la résistance à la streptomycine (2020 : 0 ; 2019 : 1) ; *aphA*, impliqué dans la résistance à gentamicine, kanamycine et néomycine (2020 : 1; 2019 : 7); *ermB*, impliqué dans la résistance à l'érythromycine (2020 : 4, 2019 : 2); *tetM*, impliqué dans la résistance à la tétracycline (2020, 1 ; 2019 : 11) et *drfD*, impliqué dans la résistance au triméthoprime (2020: 0 ; 2019: 1).

Figure 18. Distribution des diamètres des zones d'inhibition pour l'ampicilline, l'amoxicilline, la gentamicine et le triméthoprime des souches reçues entre 2013 et 2020 (Légende : le trait noir indique la valeur de référence EUCAST définissant la résistance). A : Histogrammes entre 2013 et 2020 ; B : Boîtes à moustaches entre 2012 et 2020

A



B

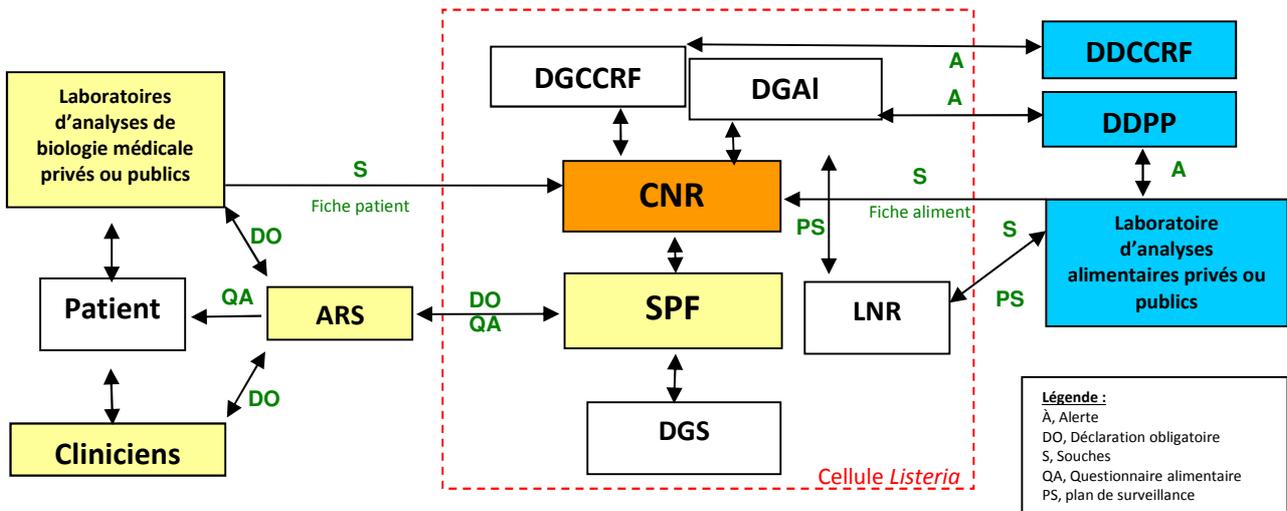


[3.5. INTERFACE AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX](#)

[3.5.1. Contribution à la surveillance nationale](#)

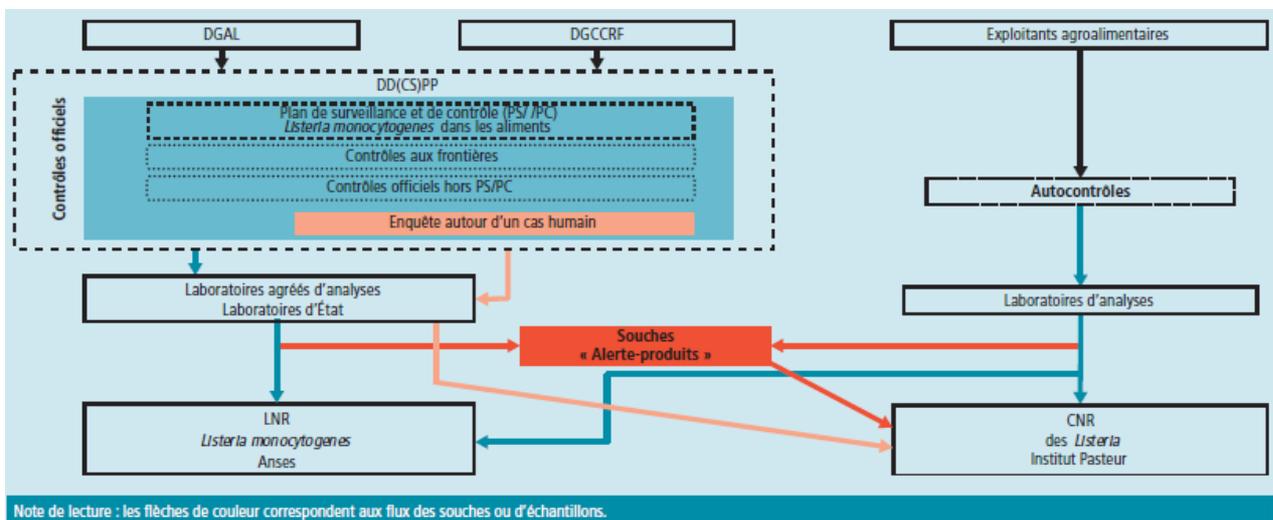
Le CNRL détecte les cas groupés et participe aux investigations destinées à identifier l'origine alimentaire des cas (37). Cette surveillance s'effectue en lien avec SPF, la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) et la Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), qui constituent la Cellule interministérielle *Listeria*, comprenant également la DGS et l'ANSES (Figure 19). Le fonctionnement de cette entité est formalisé depuis janvier 2004 par la « Procédure relative au fonctionnement de la Cellule *Listeria* chargée de la coordination des investigations et des actions autour de cas groupés de listériose ». Les missions de la cellule sont (i) la détection des cas groupés de listériose, (ii) la proposition et la coordination des investigations et actions à mettre en œuvre devant des cas groupés potentiellement liés à une source commune de contamination, (iii) leur gestion et leur prévention. Le rôle du CNRL dans la surveillance est présenté dans la Figure 20.

Figure 19. Schéma de fonctionnement de la cellule *Listeria*



CNR : Centre national de Référence des *Listeria* ; LNR : Laboratoire National de référence ; SPF : Santé Publique France ; DGAI : Direction Générale de l'Alimentation ; DDPP : Directions Départementales de la Protection des Populations ; DDCCRF : Direction Départementales de la Consommation et de la Répression des Fraudes ; DGCCRF : Direction Générale de la Consommation et de la Répression des Fraudes ; ARS : Agence Régionale de Santé ; DGS : Direction Générale de la Santé.

Figure 20. Circuit des souches sur le schéma de surveillance microbiologique français des *Listeria monocytogenes*, tel que formalisé par la Cellule *Listeria* (Source : BEH. 2012. Surveillance des *L. monocytogenes* dans les aliments. Hors-Série : 41-45 (38))



En Novembre 2019, la cellule *Listeria* s'est réunie pour fixer de nouveaux axes et outils pour la surveillance hebdomadaire décrit au chapitre 8 de ce présent rapport.

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN FRANCE

Le diagnostic de listériose repose sur l'isolement de *Lm* à partir d'un prélèvement biologique physiologiquement stérile ou de prélèvements périnataux. Les cas diagnostiqués par une autre technique (biologie moléculaire ou sérologie) ne sont à ce jour pas retenus dans le cadre de la DO (39).

L'activité de surveillance du CNRL consiste à :

1. Confirmer l'identification de la souche ;
2. Analyser les caractéristiques microbiologiques (groupe PCR, MultiLocus Sequence Typing (MLST), core génome MLST (cgMLST), sensibilité aux antibiotiques et aux désinfectants) des souches isolées de cas humains, d'aliments ou d'environnement agroalimentaires ;
3. Recueillir les informations cliniques associées aux cas ou aux souches d'aliments ou d'environnement agroalimentaires au moyen d'une fiche de renseignements.

Ces éléments permettent :

1. d'identifier les souches doublons (patients transférés dans différents hôpitaux, couples mère-enfant, etc.) ;
2. de suivre les tendances épidémiologiques (répartition des formes cliniques, caractéristiques des souches, évolution du nombre de cas, etc.) ;
3. de détecter les épidémies, par la détection de cas groupés, en caractérisant les souches isolées et en surveillant l'apparition des cas reliés ;
4. de participer à l'étude des phénomènes épidémiques en lien avec SPF : identification des cas épidémiques, du véhicule alimentaire, caractérisation de la souche épidémique.

SURVEILLANCE ET CLUSTERS

On distingue plusieurs étapes successives d'alerte, redéfinies le 10 Janvier 2017 par la cellule interministérielle *Listeria*, sur la base de l'analyse génomique cgMLST qui remplace la macrorestriction d'ADN (PFGE) :

1. Définition de cluster dans le cadre de l'analyse génomique

Un **cluster** de souches est défini en France depuis 2015 par la mise en évidence d'au moins deux souches, dont au moins une souche humaine, ayant une similarité de plus de 99,60% (7 allèles différents sur 1748 loci détectés du core génome du cgMLST).

2. Surveillance microbiologique hebdomadaire

Le CNRL effectue depuis Janvier 2017 chaque semaine un tableau de suivi des clusters (optimisé en réunion DGAI/CNRL/SPF en Janvier 2017) envoyé par courrier électronique à SPF, la DGAI et la DGCCRF, regroupant dans le détail sur les souches alimentaires/environnementales d'alertes produits, le détail anonyme sur les souches humaines des clusters et les souches d'autocontrôles des clusters simplement mentionnés par le numéro de CLIP CNRL, et les types cgMLST (CT) de ces souches. Ce tableau signale aussi les caractéristiques microbiologiques similaires des souches françaises à des alertes européennes ou internationales.

3. Surveillance renforcée

Tout cluster de plus de 2 cas est suivi d'une phase de surveillance renforcée durant laquelle le CNRL signale toute nouvelle souche d'origine humaine ou alimentaire similaire à ce cluster, tandis que SPF conduit les questionnaires alimentaires et les enquêtes épidémiologiques appropriées. La Cellule *Listeria* décide au vu des résultats de ces investigations des actions à mettre en œuvre : analyse des informations disponibles (résultats des contrôles, retraits de produits), demande de transmission au CNRL de souches isolées à la production ou à la distribution, identification des marques commercialisant les produits contaminés, prélèvements dans les magasins où s'approvisionnent les patients, enquêtes dans des établissements de production, etc. La phase de surveillance renforcée est close par décision entre le CNRL, SPF et la DGAI ou la DGCCRF.

4. Phase d'alerte

La Cellule *Listeria* peut décider du passage en phase d'alerte, définie comme toute situation présentant une menace potentielle pour la santé publique et nécessitant la mise en œuvre d'investigations ou d'actions complémentaires, soit en raison du nombre de cas détectés, soit en raison des hypothèses sur l'origine de la contamination.

La Cellule *Listeria* propose les investigations complémentaires et les actions à mener. Toutes les souches de *Lm* isolées dans le cadre de ces investigations sont envoyées au CNRL. La phase d'Alerte est levée par la Cellule *Listeria*. Certaines mesures spécifiques de surveillance peuvent être maintenues après la levée de l'Alerte.

5. Cas sporadiques, groupés et épidémies

Des cas liés à des souches de même cgMLST, mais dont la source n'a pas été identifiée sont qualifiés de groupés. Une « épidémie » correspond à des cas groupés dont la source alimentaire a été identifiée. Un cas isolé dont la source n'a pas été identifiée est qualifié de sporadique. L'accroissement du nombre de génomes dans base de données cgMLST du CNRL et l'abandon d'une fenêtre temporelle pour la comparaison des souches tend à diminuer le nombre de cas sporadiques, et à créer de clusters de grande taille. Ceci a pour conséquence la détection de sites de production alimentaire distillant sur de longues durées des souches de *Lm* d'un même cgMLST, dont l'éradication pourrait avoir un impact sur la contamination alimentaire et le nombre de cas de listérioses.

6. Toxi-infection alimentaire collective

Il s'agit de la survenue d'au moins deux cas de gastro-entérite à *Lm* dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. Selon la définition légale d'une toxi-infection alimentaire collective, la listériose n'en fait pas partie et ce point serait à reconsidérer pour tenir compte des gastroentérites à *L. monocytogenes* maintenant prouvées.

3.5.2. Contribution à la surveillance alimentaire

Les alertes-produits

Une alerte produit est déclenchée quand une denrée alimentaire non-conforme aux critères microbiologiques de sécurité du règlement européen 2073/2005 modifié (100 UFC/g ou absence/présence) (30, 40), et présentant donc un risque pour la santé publique, a été mise sur le marché et que des mesures de retrait et/ou rappel auprès du consommateur doivent être prises. Les alertes-produits peuvent être issues de contextes de surveillance variés comme les contrôles officiels, les autocontrôles effectués par les professionnels ou les plans de surveillance et de contrôle.

En France, ces alertes-produits sont déclenchées en cas de présence de *Lm* au sein de tout produit mis sur le marché, à consommer en l'état et permettant la croissance de *Listeria*, quel que soit le résultat du dénombrement, limite plus stricte que celle prévue par le règlement européen 2073/2005 modifié (100 UFC/g) (30, 40). Le CNRL effectue chaque semaine un tableau par courrier électronique aux membres de la Cellule *Listeria*, concernant les souches d'alertes-produits et leurs caractéristiques transmises. SPF investigate uniquement les clusters cgMLST où au moins une souche d'alerte produit était reliée. Les clusters 1 souche humaine/1 souche alimentaire ou environnementale étant très présents, de nombreuses investigations ont été demandées aux DDPP ce qui a changé les demandes habituelles sur des larges cas groupés. Le CNRL réalise chaque semaine la recherche du résistome (gènes impliqués dans la tolérance à des désinfectants comme les ammoniums quaternaires et de la résistance aux antibiotiques) et du virulome (gènes de virulence) des souches de *L. monocytogenes* issues d'alertes produits ce qui permet d'informer les DDPP locales qu'un produit comme le chlorure de benzalkonium ne doit pas être utilisé, car la souche présente une tolérance.

Les enquêtes autour d'un cas de forme neuroméningée

Depuis 2001, pour tous les cas d'infection neuroméningée (cas avec signes cliniques d'atteinte neuroméningée et souche de *Lm* isolée du sang ou du LCR), des prélèvements des aliments dans le réfrigérateur du patient ou de son environnement (avec l'accord du patient ou le cas échéant de sa famille) sont réalisés par la DDPP. Des prélèvements dans les lieux d'achats du patient par la DDPP ou la DDCCRF peuvent également être effectués. Le CNRL compare le Type cgMLST des souches isolées des aliments à celle(s) isolée(s) chez le patient afin de tenter d'identifier l'aliment à l'origine du cas.

3.5.3. Alerte sur les résistances atypiques aux traitements de référence

La surveillance de la résistance de *Lm* aux antibiotiques est effectuée pour 23 antibiotiques (céfotaxime, sulfonamides, kanamycine, clindamycine, rifampicine, tétracycline, érythromycine, chloramphénicol, ciprofloxacine, moxifloxacine, lévofloxacine, triméthoprime, gentamicine, acide fusidique, vancomycine, streptomycine, pénicilline G, ampicilline, amoxicilline, acide nalidixique, imipénème, fosfomycine), à la recherche de résistances naturelles ou acquises, selon la méthodologie EUCAST de diffusion. Les résultats de la surveillance des souches d'origine humaine isolées de 2019 et 2020 ont été présentés dans le chapitre 3.4.

3.5.4. Alerte infections nosocomiales

Le caractère nosocomial des infections à *Lm* est difficile à établir, car l'incubation de la listériose peut être longue (41) et la source alimentaire de l'infection est difficile à identifier.

Ce mode de contamination a été décrit :

- soit par des aliments consommés à l'hôpital,
- soit par transmission croisée, notamment par le biais de matériel contaminé par un enfant infecté (thermomètres, couveuses, table à langer, huile de soins) ou interhumaine en mettant des nouveaux nés dans la même pièce.

Le pouvoir de discrimination du cgMLST permet la détection de souches d'infections nosocomiales transmises jusqu'en 2015 en cas de persistance dans des cuisines hospitalières. Cette identification de ces clusters spécifiques déclenche une notification à SPF et une enquête impliquant SPF, l'ARS, la DGAL/DDPP et le CNRL ainsi que le CLIN et l'hygiéniste hospitalier concerné est conduite pour identifier l'origine de l'infection.

Les bactériémies ou infections neuroméningées contractées chez des patients hospitalisés depuis plus de 15 jours et sans apport de nourriture extérieur entraînent une inspection de la cuisine hospitalière, et la réalisation de prélèvements alimentaires et de surface.

→ Une meilleure information aux hygiénistes pourrait être délivrée pour les informer des modalités de surveillance et de la performance de l'analyse génomique pour la détection de cas nosocomiaux.

3.5.5. Interface avec les acteurs nationaux et internationaux

SPF : Le CNRL est en lien quotidien avec SPF pour la surveillance nationale et le suivi de dossiers de souches humaines ou d'investigations, et pour la gestion de phénomènes anormaux. Des alertes sur la surveillance permanente des informations françaises web sur les *Listeria* sont également adressées à SPF ainsi qu'aux autres membres de la cellule *Listeria*.

DGS – DGAL – DGCCRF : Le CNRL est en lien pluri-hebdomadaire avec la DGAL dans le cadre du suivi des alertes-produits et des enquêtes sur les formes neuroméningées ou une demande d'appui technique. Le CNRL participe à des réunions coordonnées par la DGS dans le cadre de gestion d'alertes, de cas groupés ou d'épidémies. Le CNRL, au sein de la cellule *Listeria*, est en lien direct et simultané avec la DGS, DGAL et la DGCCRF.

ANSES et LNRI : Cette interaction est décrite dans le chapitre 7 de ce rapport. Jusqu'en avril 2019, le CNRL a participé à l'examen de saisines DGS/DGCCRF/DGAL ou des demandes d'avis par le CES « BioRisk » de l'ANSES en tant qu'expert si sollicité.

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN EUROPE

ECDC

L'ECDC a mis en place un système volontaire d'investigations de cas groupés ou d'épidémies européens au moyen de la plateforme d'échanges EPIS (Epidemic Intelligence Information System), ouverte aux 27 pays européens et à 51 pays non-européens.

Le CNRL, en relation avec SPF, répond à toutes les alertes déposées sur la plateforme EPIS (2020 : 7; 2019 20).

Le CNRL a aussi participé :

- au groupe de travail *Listeria* du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire (FWD) (M. Lecuit & A. Leclercq)
- à la consultation sur le draft « EU protocol for enhanced surveillance of listeriosis » en 2019 ;
- à une enquête sur « Upgrade of the ECDC-EFSA joint database for whole genome sequencing » en 2019 ;

- à la demande de l'ECDC sur la collecte des données et génomes des cas de listériose « Initiation of WGS-enhanced real-time data collection of *Listeria* isolates from 1 march 2019 » ;
- à la rédaction en 2019 de l'article « Joint ECDC-EFSA rapid outbreak assessment : Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products, UI-452 » (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/multi-country-outbreak-listeria-monocytogenes-fish-products>) décrit au chapitre 4.8 ;
- à la gestion de l'alerte EPIS UI-552 en 2019 concernant des fromages français contaminés et EPIS UI-630 des USA en 2020 sur des champignons ENOKI dont la France a indiqué l'origine sur la base de prélèvement alimentaire de la DGCCRF décrites au chapitre 4.8 ;
- à l'investigation en 2020 de l'UI-632 d'Allemagne sur 5 épidémies avec indication du Saumon comme origine de 2010 à 2019 avec révision d'un rapport Joint ECDC-EFSA Notification Summary of a cross-border threat to Health : « *Multi-country clusters of Listeria monocytogenes infections ("Beta2", "Delta1", "Eta5", "Omega5", and "Rho3") linked to salmon products from Poland, France and possibly Germany – 28 May 2020* » ;
- à la révision de l'Atlas de surveillance Food and Waterborne diseases (données 2018 et 2019) ;
- à participer à l'actualisation de la base TESSY par SPF avec les données françaises en 2019 et 2020 ;
- à la révision du rapport ECDC sur ELITE (European Listeria Typing Exercise) en 2020 publié en mars 2021 (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/joint-ecdc-efsa-and-eurl-lm-report-european-listeria-typing-exercise-elite>).

DG SANTE (RASFF)

Le réseau RASFF de l'Union européenne est un outil d'échange d'informations sur les mesures prises pour garantir la sécurité alimentaire : les notifications d'alertes (produits alimentaires à risque sur le marché nécessitant une action immédiate) et notifications informatives (mise en place d'une alerte nationale ayant entraîné des mesures telles que le retrait ou le refus de produits alimentaires) sont transmises aux membres du réseau (DGAI, DGCCRF, SPF), qui les communiquent au CNRL.

Ce système est complété au niveau mondial par le réseau INFOSAN de l'OMS. Le CNRL/CCOMS est contacté pour expertiser certaines alertes en relation avec des urgent inquiries ECDC (Chapitre 4.5.). Le CNR a communiqué des séquences génomiques françaises dans le cadre d'alertes RASFF et d'Urgent Inquiry.

CEN (Comité Européen de Normalisation)

En 2019 et 2020, le CNRL a participé en normalisation de la Microbiologie de la chaîne alimentaire concernant *Listeria* :

- aux réunions Afnor V08B, CEN TC275/WG6 et ISO TC34/SC9 sur les méthodes EN ISO 11290 de détection et d'énumération des *Lm* et *Listeria* spp. dans la chaîne alimentaire ;
- au développement des normes NF EN ISO 16140-6 et NF EN ISO 16140-7 sur la validation des méthodes microbiologiques de confirmation (identification, typage moléculaire) ;
- à l'ISO TC34/SC9/WG25 sur la normalisation du Whole Genome sequencing et typages associés.

EURL *Lm*

Le laboratoire de référence des *Listeria* de l'Union européenne (EURL) est situé au laboratoire ANSES-LSA de Maisons-Alfort, également LNRI. Ses missions consistent à l'analyse de l'antibiorésistance des souches zoonotiques et la mise au point de méthodes d'essais dans le domaine alimentaire et vétérinaire pour la détection, l'énumération et la caractérisation des *Lm*.

En 2019, mais pas en 2020, l'EURL *Lm* a sollicité le CNRL dans le cadre d'analyses déjà effectuées par le CNRL pour 3 Urgent Inquiry.

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE INTERNATIONALE DE LA LISTERIOSE

OMS

L'Unité de Biologie des Infections héberge le Centre Collaborateur de l'OMS des *Listeria* (Site web : <http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-collaborateurs-l-oms-ccoms/listeriose-d-origine-alimentaire>). Son mandat a été renouvelé le 01 Novembre 2019 par l'OMS pour un mandat se terminant en Novembre 2023.

Dans ce cadre, le CNRL participe à la surveillance internationale de la listériose et de la résistance aux agents antimicrobiens des *Listeria*, à la collecte de données pour l'analyse des risques réalisée par l'OMS et à la formation des personnels qui le contactent (42, 43).

Le CNRL répond aux sollicitations de l'OMS et apporte son expertise en cas de crise sanitaire.

En 2019-2020, Le CNRL/CCOMS a participé :

- à l'accueil des stagiaires comme décrit au point 5.1.2. de ce rapport.
- à la gestion de l'épidémie de listériose en Afrique du Sud (2017-2019)
- au Second Global Meeting of the FAO/WHO International Food Safety Authorities Network (Infosan), 9-11 décembre 2019, Abhu Dhabi, Emirats Arabes Unis, à la session 2 INFOSAN in action sur *Listeria*. A. Leclercq a réalisé 2 présentations orales "Introduction/background to *Listeria monocytogenes*" et "Perspectives from the WHO CC for *Listeria*" (<https://www.who.int/publications-detail/9789240003934>)
- à la relecture pour la FAO et l'OMS pour le Département de Food Safety de l'OMS en 2019 du guide INFOSAN Member's guide version 13 août 2019 et d'une publication « Food safety digests » sur « *Listeria monocytogenes* et listériose » pour les gestionnaires du risque, les exploitants du secteur alimentaire et les consommateurs.
- au groupe de travail mixte FAO/OMS JEMRA (Joint Evaluation Microbiological Risk Assessment ; Alexandre Leclercq, Octobre-Novembre 2020, expert *Listeria*,) sur « microbiological risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food: attribution, characterization and monitoring » pour l'édition d'un rapport de l'Evaluation des Risques Microbiologiques actualisant celui réalisé en 2004 (https://cdn.who.int/media/docs/default-source/food-safety/jemra/listeria-meeting-summary-and-participantlist-oct-nov-2020.pdf?sfvrsn=eadab9f9_5).

Office International des Epizooties (OIE)

Le CNRL à travers le CCOMS répond aux sollicitations de l'OIE sur des questions concernant *Listeria* dont la coordination de la révision du chapitre *Listeria monocytogenes* finalisé en septembre 2020 pour le Terrestrial manual OIE 2022.

3.6. ENQUETE OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE

- **MONALISA** : Les inclusions dans la cohorte MONALISA (Multicentric Observational National Analysis of LIsteriosis and *Listeria* ; Charlier et al., *Lancet Infect Dis* 2017) se poursuivent, pour les neurolistérioses et les infections materno-néonatales (financement initial Programme Hospitalier Recherche Clinique).

- **MONALISA-BABY** : L'analyse du devenir à 6 ans des enfants avec listériose périnatale a débuté en 2015 (CRC AP-HP 80k€), et permettra d'établir s'il existe chez ces enfants des séquelles à long terme, et le rôle respectif de la prématurité, du sepsis et de l'infection du système nerveux central dans ces séquelles éventuelles (collaboration avec PY Ancel, responsable de la cohorte EPIPAGE2).

- **MONALISA-TREAT** : Essai thérapeutique simulé visant à évaluer 4 stratégies antibiotiques différentes dans le cadre des listérioses invasives : traitement précoce (probabiliste) ou retardé jusqu'à la confirmation à J2 en culture de l'infection, par amoxicilline seule ou couplée à la gentamicine. L'approche d'essai thérapeutique simulé permet de mimer les conditions d'un essai sur la base de données de cohorte collectées prospectivement. Ce travail est mené en collaboration avec Ph RAVAUD (CRESS Hôtel Dieu), et financée par la Fondation Sauver La Vie (30k€).

- **MONALISA-GENBIO** : Etude de la susceptibilité génétique de l'hôte vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* (génotypage SNPs des 1100 patients et témoins de l'étude, séquençage d'exome des patients présentant des formes particulièrement sévères ou survenant en l'absence de toute susceptibilité identifiée). En collaboration avec l'équipe de génétique humaine évolutive (Lluis Quintana, Etienne Patin, Institut Pasteur) et celle de Dusan Bogunovic (Mount Sinai Hospital, NYC, USA). (ANR/PRTS 850k€).

4. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE ET ALERTE

L'ensemble du système de surveillance et d'alerte français a été décrit dans le chapitre 3.5.

Le détail des clusters et les investigations qui en découlent sont des informations confidentielles de la Cellule Listeria et ne peuvent faire l'objet d'une analyse détaillée dans ce rapport d'activité.

4.1. SUSPICIONS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES

En 2020, le diagnostic de listériose a été porté après 15 jours d'hospitalisation dans 22 cas (25 en 2019), faisant discuter la possibilité de listérioses nosocomiales (la mise en évidence de cas de listériose groupés temporellement et géographiquement (même hôpital, voire même service)) (44, 45). Dans 2 cas (clusters 364 et 366) en 2019, des souches formaient un cluster qui a été investigué.

Les investigations dans les établissements de santé ont conduit à souligner les points suivants :

- La nécessité de communiquer au CNRL l'ensemble des souches prélevées dans le cadre des prélèvements d'environnements des cuisines d'établissements de soins ;
- L'application de la bonne méthodologie de prélèvement des échantillons d'environnement ;
- Les renseignements apportés par le CNR sur la tolérance aux désinfectants ce qui a permis d'adapter la procédure de nettoyage-désinfection en conséquence pour éliminer la souche ;
- La possibilité d'échanger avec des homologues étrangers en cas d'établissements frontaliers ;
- Considérer le céleri comme un aliment à risque pour les établissements de soins suite à plusieurs épisodes de contamination en établissements de soins en France et aux USA, à intégrer au questionnaire alimentaire.

4.2. CLUSTERS cgMLST

Depuis Janvier 2015, le CNRL utilise le séquençage du génome complet des souches (WGS) et la méthode de typage core génome MLST (cgMLST) pour identifier les clusters de souches humaines et/ou humaines + alimentaires/environnementales (8, 9).

En 2019-2020, le CNR a identifié 123 [2020 : 54, 2019 : 69] nouveaux clusters et 124 [2020 : 62, 2019 : 62] clusters identifiés avant 2019 ont été actualisés avec l'inclusion de nouvelles souches (humaines, alimentaires ou environnementales). Au total 247 clusters cgMLST (2020 : 116 ; 2019 :131) ont été investigués.

En 2020, ces 116 clusters étaient constitués de 436 souches (2019 : 1041), dont 159 (2019 : 191) souches humaines et 798 (2019 : 277) souches non humaines (alimentaires : 199 et environnementales 78) comprenant 221 (51% contre 64% en 2019) souches d'alertes produits ou d'investigation autour d'un cas humain. 11 souches de 2020 (2019 : 15) sont à ce jour incorporées dans 9 clusters de 2021 (contre 11 en 2020).

Parmi les 123 nouveaux clusters cgMLST identifiés en 2019-2020, les investigations menées conjointement par le CNR, Santé publique France et la DGAL ont permis d'identifier une source de contamination dans 18% (2020 : 11% ; 2019 : 23%) de ces clusters. En 2020, les nouveaux clusters comportaient de 1 à 6 souches humaines avec une médiane à 1 cas (contre 1 à 11 et médiane de 2 cas en 2019) et 70% (2019 : 78%) avaient moins de 3 souches humaines.

Les clusters sont répartis de la façon suivante :

- clusters ponctuels, non évolutifs,
- clusters humains et alimentaires/environnementaux persistants,
- clusters majoritairement alimentaires/environnementaux persistants, avec très peu de cas humains.

Il persiste des clusters purement alimentaires avec des alertes produits sur différentes années signant la persistance de la souche et une exposition humaine.

Le haut pouvoir de discrimination du cgMLST permet de s'affranchir des fenêtres temporelles et spatiales lors de l'investigation des cas groupés. Le cgMLST permet ainsi de détecter des cas liés qui sont géographiquement et temporellement séparés.

Ces caractéristiques sont intéressantes, compte tenu :

- de la distribution rapide des aliments à larges échelles,
- de la conservation d'aliments potentiellement contaminés par congélation sur des périodes de plus de 6 semaines,
- de la persistance des souches chez des opérateurs agroalimentaires ou des établissements de soins.

Ceci souligne également la nécessité d'avoir une plus grande exhaustivité des souches d'autocontrôles permettant d'accroître la capacité de détection des sources de contamination du système de surveillance français.

Le tableau 6 récapitule les épidémies de 1992 à 2020 en France avec identification de la source alimentaire.

4.3. TOXI-INFECTIIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES

Aucune toxi-infection alimentaire collective à *Listeria monocytogenes* n'a été portée à notre connaissance depuis 2018.

Étant donné l'existence de gastroentérites à *L. monocytogenes*, la définition officielle des toxi-infections alimentaires collectives devrait inclure *L. monocytogenes*.

4.4. ALERTES-PRODUITS DGAL

Ces alertes et investigations ont pour but d'identifier des souches alimentaires qui ont des caractéristiques microbiologiques similaires à celles des souches à l'origine d'infections. Les aliments faisant l'objet de ces alertes peuvent avoir diverses origines, avoir été commercialisés ou non, enregistrés par la DGAL sous la forme (i) d'une non-conformité *Listeria*, (ii) d'une notification par une Direction Départementale de Protection des Populations ou (iii) d'une notification via le réseau européen des alertes RASFF. En 2020, la fiche de renseignements du CNRL a été revue avec la MUS/DGAL afin d'incorporer de nouvelles demandes de renseignements permettant un meilleur suivi des producteurs et des alertes à la distribution.

Tableau 6. Tableau récapitulatif des épidémies françaises de plus de 2 cas de 1992 à 2019

Année	Nombre de cas	Aliments
1992	279	Langue de porc en gelée
1993	38	Rillettes
1995	36	Brie
1997	14	Pont-l'Évêque
1999	4	Époisses
2000	10	Rillettes
2000	32	Langue de porc en gelée
2002	11	Saucisse à tartiner (tartinette)
2003	4	Mortadelle
2012	11	Brie
2013	6	Brebis
2013	11	Quenelles
2013	3	Brebis
2013	2	Brebis
2013	7	Etablissement de soins
2014	2	Maroilles
2014	11	Charcuteries
2015	2	Saint-Nectaire
2015	3	Saint-Nectaire
2015	4	Saint-Nectaire
2015	13	Andouille
2015	2	Saint-Nectaire
2015	3	Fromage de vache
2015	2	Contamination d'environnement de production - Artisan
2015	3	Saint-Nectaire
2016	21	Reblochon
2016	2	Brie aux truffes
2016	2	Charcuterie
2016	19	Fromage de vache (TIAC)
2017	2	Reblochon
2018	2	Fromage de chèvre
2018	18	Brie au lait cru
2018	2	Produits traiteurs
2018	3	Boucherie
2018	3	Viande de cheval
2018	2	Céleri
2018	3	Brebis
2019	15	Brie au lait cru
2019	3	Charcuteries
2019	8	Yaourt bio
2019	2	Jambon
2019	2	Etablissement de restauration collective
2019	4	Fromages
2019	4	Etablissement de soins
2019	11	Fromages
2019	10	Charcuteries
2020	4	Charcuteries
2020	4	Truite fumée

En 2020, 849 souches (2019 : 1663, -51% et pour 2019 par rapport à 2018 : 1183, +40%) ont été adressées au CNRL dans le cadre des 285 (2019 : 395) alertes-produits DGAI, DDPP et des Armées. Ces souches incluaient 634 (2019 :1202) souches alimentaires, 210 (2019 : 451) souches d'environnements agroalimentaires, 2 (2019 : 10) souches d'autocontrôles demandés par les autorités compétentes.

Le nombre de souches par alerte-produit en 2019-2020 variait de 1 à 190 avec 3 alertes produits importantes.

En 2019 et 2020, les 352 et 166 alertes-produits respectivement (2019-2020, -47%) qui ont été répertoriées par la DGAI incluait :

- 155 (2019 : 331) alertes suite à un autocontrôle sans alerte RASFF ;
- 4 (2019 : 6) alertes suite à un contrôle officiel ;
- 3 alertes (2019 : 5) suite à plan de surveillance / plan de contrôle DGCCRF dont une en 2019;
- 1 (2019 : 3) alertes autour d'un cas humain du cluster 295 ;
- 1 alerte en 2019 suite à un contrôle aux frontières, information des autorités canadiennes sur un fromage au lait cru français ;
- 3 (2019 : 1) alertes sans précision d'origine.

En cas d'alerte RASFF, le CNRL, sur la demande de la DGAI, demande à ses homologues étrangers les séquences génomiques assemblées ou les reads des souches *Lm* isolées des aliments incriminés.

En 2019, à 3 reprises, la DGAI a sollicité des typages génomiques en urgence.

En 2020, 968 notifications (2019 : 330) ont été faites à la Commission Européenne pour des denrées alimentaires avec des pathogènes alimentaires dont 98 (120 en 2019) concernaient *L. monocytogenes* comprenant 24 (2019 :30) notifiées par la France et 22 (2019 : 9) par des pays étrangers ayant un lien avec un produit français (https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en). Le CNRL n'a pas participé aux investigations RASFF sans lien avec les urgent inquiry ECDC puisqu'aucune souche ou séquence n'a été envoyée au CNRL.

En 2019 et 2020, le **taux moyen d'exhaustivité de récupération des souches d'alertes-produits était de 72% et 71% respectivement ce qui** stable de 2011 à 2017 (moyenne : 72%) sauf pour 2018, 62%.

L'absence d'envoi de souches d'alertes-produits au CNRL peut s'expliquer par :

- La méconnaissance du système d'alertes-produits ;
- L'absence de l'obtention de numéro d'alerte par la DDPP locale ;
- Le fait que les alertes-produits concernant une contamination < à 100 UFC/g n'aboutissent pas à l'envoi des souches au CNRL par le laboratoire ;
- Le client peut refuser l'envoi des souches au CNRL, car cet envoi n'est pas obligatoire ;
- Les souches ne sont pas toujours conservées par le laboratoire ou sont non viables.

En 2020, 98,6% (2019 : 96%) des souches issues d'aliments isolées dans le cadre des alertes-produits et envoyées au CNRL parce qu'elles ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Lm* par le laboratoire expéditeur ont été confirmées comme *Lm* par le CNRL. Cette confirmation de l'espèce est importante dans le cadre des suites économiques, judiciaires, voire diplomatiques, de ces alertes produits.

La répartition par groupe PCR des 831 souches de *Lm* isolées d'aliments et d'échantillons environnementaux dans le cadre des alertes-produits était la suivante :

- Groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a) : 569 souches (68% ; 54% en 2019)
- Groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7) : 38 souches (5% ; 6% en 2019)
- Groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c) : 70 souches (8% ; 12% en 2019)
- Groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) : 154 souches (19% ; 28% en 2019)
- Groupe PCR IVb-V1 (sérovar 4b) : 0 souche (0% ; 0% en 2019)
- Groupe PCR L (sérovars 4a, 4ab, 4c) : 0 souche (01% ; <1% en 2019)

En 2020, les complexes clonaux de *Lm* les plus fréquents à l'origine d'alertes-produits sont, par ordre décroissant, le CC121, CC8, CC9, CC101, CC1 alors qu'en 2019, il s'agissait du CC121, CC9, CC2, CC37, CC6, CC4, CC1 et CC8.

Les dénombrements de *Lm* dans les échantillons concernés par les alertes-produits variaient de < 10 à >13.600.000 UFC *Lm*/g contre <10 à 22000 UFC *Lm*/g en 2020. 41 (25%) alertes-produits (2019 : 77 ; 22%) ont été reliées à un cluster cgMLST avec cas humains. Comme depuis 2007, ils concernaient principalement par ordre décroissant des produits de viandes, surtout des charcuteries, de produits laitiers dont principalement des fromages au lait cru, de

produits de la pêche, et de plats préparés. 16 alertes produits concernaient des viandes de poulet ce qui est en augmentation (2019 : 14), alors qu'il s'agit d'aliments peu connus pour être contaminés par *Listeria monocytogenes*.

En 2019, le CNRL a répondu à 5 alertes produits médiatisées (2018 :5).

Une alerte a concerné des sandwiches au thon proposé en libre-service (buffets à bord), potentiellement contaminés à *Lm* distribués aux passagers sur neuf vols long-courriers de la compagnie aérienne Air France entre le 21 et le 24 mai 2019. Aucun cas de listériose n'a été signalé par la Compagnie, mais tous les produits du fournisseur impliqués ont été retirés du service. La compagnie aérienne a informé ses clients par mail, par voie de presse et son site internet.
=> La gestion d'alerte produit pour les repas servis à bord des avions pourrait être formalisée, concernant l'information des pays tiers accueillant les passagers pour détecter d'éventuels cas humains.

En 2020, le CNRL a communiqué les informations de 13 (2019 : 64) souches d'autocontrôles privés étant dans des clusters français en application de la loi EGALIm et du code rural à la DGAL.

4.5. ALERTES PRODUITS DGCCRF

En 2019, 5 alertes-produits (Saumon, charcuteries, produits carnés de porcs et de volailles) provenaient de la DGCCRF ou de ses laboratoires survenus contre 3 (charcuterie, produits carnés) en 2020 et ont donné lieu à la réception au CNRL de 5 souches en 2019 contre 18 en 2020 (2019 : 2 alertes DGAL de PS/PC DGCCRF sans souche communiquée au CNRL (Alertes 334 et 677)). Ces alertes sont mises en place lorsque des échantillons alimentaires ne répondent pas aux critères microbiologiques réglementaires pour *Lm* lors de l'application du plan de contrôle et de surveillance pour *Listeria* (<https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/contamination-des-aliments-a-distribution-par-listeria-monocytogenes-0>).

Depuis 2012, ces alertes-produits DGCCRF sont transformées en alertes-produits DGAL.

La DGCCRF a réalisé en 2019 un plan de contrôle à la distribution concernant la contamination des produits de fabrication industrielle : produits à base de viande cuite/crue/fumée, les fromages et produits laitiers, et les produits à base de poisson ou produits de la pêche et sur les laits infantiles et les fruits et légumes (sauf déshydratés).

4.6. ENQUETES DES FORMES NEUROMENINGEES (ENQUETES « FRIGO »)

Cette enquête est menée par les différents partenaires de la Cellule *Listeria*, et coordonnée par SPF. Elle est mise en place depuis août 2001. Lors de la notification d'un cas de listériose neuroméningée, les investigations par la DDPP consistent à réaliser des prélèvements d'aliments dans le réfrigérateur ou l'environnement du patient (avec son accord ou celui de sa famille). Le CNRL réalise un groupage PCR et un typage par cgMLST sur les souches alimentaires prélevées et celle du patient et compare ensuite les type cgMLST des souches afin d'identifier l'aliment à l'origine du cas et transmet les résultats à la Cellule *Listeria*.

En 2020, 64 listérioses neuroméningées (2019 :91) ont été déclarées aux autorités sanitaires. Pour 50 (78%) d'entre elles (2019 : 85%), la réalisation de prélèvements alimentaires/environnementaux autour du patient a été demandée. Ces prélèvements ont pu être réalisés pour 50% (2019 : 52% ; 2018 : 54%).

Ces 32 (2019 : 47) cas neuroméningés suivis de prélèvements ont donné lieu à 28 (2019 : 44) enquêtes dans le réfrigérateur du patient, 1 (2019 :2) enquête en établissements de soins, et 5 (2019 :5) enquêtes en points de vente fréquentés par le patient.

Parmi les 8/28 (2020 : 29% ; 2019 :18%) enquêtes réfrigérateur ayant isolé une souche de *Listeria*, la souche isolée des aliments du frigo était similaire en cgMLST à la souche du patient pour 6 (75% ; 2019 : 63%)(46). Aucune des enquêtes conduites en établissement de soins en 2019 et 2020 n'a mis en évidence de *Listeria* pour ces cas neuroméningés suivis de prélèvements et pour une enquête auprès de points de vente fréquentés seulement en 2020.

Ainsi, les prélèvements à domicile effectués pour les cas de listérioses neuroméningées sont un complément utile à la DO et permettent d'identifier rapidement la source de contamination.

4.7. «URGENT INQUIRIES» DE L'ECDC

En 2019, le CNRL a été informé d'alertes-produits communautaires soit par l'ECDC au moyen de la plateforme EPIS, soit par la DGAI au moyen du réseau RASFF (alertes-produits), soit par l'OMS/FAO au moyen du réseau INFOSAN. Le CCOMS-CNRL récupère auprès d'opérateurs agroalimentaires étrangers, les souches d'alertes-produits européennes ou internationales, ainsi que les souches des lots incriminés ayant circulé sur le territoire français. Ces souches sont alors introduites dans la surveillance nationale. Les homologues étrangers du CNRL peuvent aussi lui demander l'envoi de souches ou de génomes dans le cadre de cas groupés ou d'épidémies déclarés par la France ou de RASFF. En accord avec SPF et la DGAI, une réponse sur l'occurrence du cgMLST type dans les souches cliniques et alimentaires françaises est rapportée sur le site EPIS et la séquence est archivée dans le logiciel en ligne BIGSdb *Listeria* au moyen d'un identifiant.

En 2020, le CNRL a investigué 7 « urgent inquiries » par cgMLST (20 en 2019) de l'ECDC (communiquées sur la base EPIS). Dans chaque cas, en lien avec SPF et la DGAI/DGCCRF, le CNRL communique sur EPIS une synthèse des souches d'origines humaine et alimentaire du même cgMLST Type que la souche/les souches investiguées et met à disposition les séquences des souches françaises à l'ECDC ou à l'EURL Lm avec les métadonnées si autorisation des autorités compétentes françaises.

Des cas humains survenus en France ont été reliés microbiologiquement à des souches de ces alertes-produits internationales.

Le CNRL a participé à la rédaction avec l'ECDC/EFSA et à l'envoi de séquences à l'EURL Lm dans le cadre de :

- la Rapid outbreak assessment on UI-452 and RASFF notification 2018.2870 (cgMLST type L2-SL8-ST8-CT4158). *Rapport publié: EFSA, ECDC, et al. (Donguy MP, Tourdjman M, Lecuit M, Leclercq A, Maury M, Moura A). Multi-country outbreak of Listeria monocytogenes clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products. 2019 June 4; https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/20190423_Joint_ECDC-EFSA_ROA_UI-452_Lm-ST1247.pdf*
- la Rapid outbreak assessment on UI-583 and RASFF notification 2019.3490 (cgMLST type L1-SL6-ST6-CT443); *Rapport publié : EFSA, ECDC, et al. (Tourdjman M, Lecuit M, Leclercq A, Maury M, Moura A). Multi-country outbreak of Listeria monocytogenes sequence type 6 infections linked to ready-to- eat meat products. 2019 Novembre 25. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Listeria-rapid-outbreak-assessment-NL-BE.pdf>*
- L'article, Halbedel S, Wilking H, Holzer A, Kleta S, Fischer MA, Lüth S, Pietzka A, Huhulescu S, Lachmann R, Krings A, Ruppitsch W, Leclercq A, Kamphausen R, Meincke M, Wagner-Wiening C, Contzen M, Kraemer IB, Al Dahouk S, Allerberger F, Stark K, Flieger A. 2020. Exceptionally large and country-wide outbreak of invasive listeriosis associated with blood sausage consumption, Germany 2018-2019, décrit au point 6.1.1. de ce rapport, concernant l'UI-516 où l'investigation du cas français et sa séquence génomique ont apporté une aide à la résolution de cette épidémie.

4.8. EPIDEMIE

Epidémie en Espagne en 2019

Le 16 août 2019, les Autorités sanitaires régionales d'Andalousie (Espagne) ont signalé une épidémie de listériose à *Listeria monocytogenes*, associée à la consommation de viande de porc rôtie et réfrigérée contaminée à plus de 15.000 UFC/g fabriquée en Espagne par Magrudis Company Limited et vendu sous la marque « La Mechá ». Les autorités espagnoles ont notifié le 20 août 2019 cette épidémie à l'Organisation mondiale de la Santé par le biais du Réseau international des autorités de sécurité sanitaire des aliments (INFOSAN) et une urgent Inquiry N°594 a été ouverte dans le système EPIS de l'ECDC. Le 23 août, les autorités espagnoles ont publié une alerte concernant la sécurité sanitaire des aliments, dans laquelle elles conseillaient aux consommateurs d'éviter tous les produits vendus par cette marque, rappelant aussi qu'une petite quantité de la viande rôtie réfrigérée impliquée était également

vendue par une autre société sans aucune marque commerciale. Le CNRL a participé avec la cellule *Listeria* sous l'égide du CORRUSS à l'investigation du RASFF 2019.2989 en août 2019.

Du 7 juillet au 13 septembre, au total 222 cas confirmés liés à cette épidémie ont été signalés dans cinq régions espagnoles : Andalousie (214), Aragon (4), Estrémadure (2), Castille et Leon (1) et Madrid (1). Sur l'ensemble des cas, 57 % sont des femmes, dont 38 étaient enceintes, et 24 % des personnes âgées de 65 ans et plus (24 hommes et 25 femmes). Trois décès ont été notifiés chez des personnes âgées atteintes de listériose au moment de leur mort. On rapporte également que six femmes ont fait des fausses-couches en lien avec cette flambée. Le 23 août 2019, la France a notifié par l'intermédiaire du système d'alerte précoce et de réaction (EWRS) de la Commission européenne un cas lié à un voyage impliquant un citoyen étranger s'étant rendu en Andalousie et ayant consommé le produit incriminé. Ce cas de listériose chez un homme de 31 ans, résident du Royaume-Uni, qui a voyagé à travers la France à son retour d'un séjour à Séville. À Séville, il avait partagé un repas composé de porc froid avec 4 amis, le 13/08/2019. Le lendemain, ces amis ont présenté de la fièvre et consulté le service des urgences d'un hôpital de Séville, où on leur a dit que leur fièvre était probablement due à une infection par *Listeria*, contractée par leur consommation de porc froid. Le cas en France présentait également de la fièvre et a été hospitalisé pendant une journée le 16/08/2019. Il est sorti de l'hôpital et a continué son voyage au Royaume-Uni. La souche de *Lm* a été isolée d'une hémoculture. Le génome de cette souche du patient anglais a été transmis au Public Health England à sa demande par le CNRL.

Seuls trois cas de listériose ont été enregistrés à une date de consommation postérieure au 17 août, mais ces trois personnes avaient acheté le produit avant le lancement de l'alerte.

Epidémie aux USA en 2020 (Alerte INFOSAN) – Urgent Inquiry UI-630

En collaboration avec le CDC d'Atlanta (USA), Dr Amanda Conrad, l'unité des alertes DGCCRF et SpF

Article en cours de soumission à Journal of Food Protection : A. Tesfai, A. Conrad, E. Pereira, L. Palacios, R. Kandari, A. Kearney, A. Locas, F. Jamieson, E. Elliot, M. Otto, K. Kurdilla, M. Tijerina, I. Son, J. Pettengill, Y. Chen, T. Fox, C. Lane, R. Aguilon, J. Huffman, M. Wise, L. Edwards, S. Bidol, H. Blankenship, H. Rosen, J. Vidanes, A. Leclercq, M. Lecuit, M. Tourdjman, H. Herber, L. S. Singleton, M. Bazaco, S. Viazis. Multinational Outbreak of Listeria monocytogenes Infections Linked to Enoki Mushrooms Imported from the Republic of Korea 2016-2020.

Abstract: This investigation provides a powerful example of the impact of national and international collaborative efforts to respond to foodborne illness outbreaks and protection of consumers. It also demonstrates the importance and efficiency of fast international data sharing and collaboration in identifying and stopping foodborne outbreaks in the global community. This investigation also provides a powerful and meaningful example of the importance of food sampling and testing.

Mention de l'implication du système de surveillance français ayant permis de trouver l'origine de cette épidémie et de la collaboration internationale effectuée : *J. B Pettengill, A.n Markell, A. Conrad, H.A Carleton, J. Beal, H. Rand, S. Musser, E. W Brown, M. W Allard, J. Huffman, S. Harris, M.Wise, A Locas, A multinational listeriosis outbreak and the importance of sharing genomic data, The Lancet Microbe, Volume 1, Issue 6, 2020, Pages e233-e234,*

4.9. ENQUETE JUDICIAIRE

Depuis 2013, des demandes auprès de SPF de restitution de rapports individuels d'investigations autour de formes neuroméningées ont été faites par les autorités judiciaires dans le cadre de procédures intentées par un cas ou son entourage, et des particuliers souhaitant obtenir les résultats des investigations réalisées à leur domicile. Ces demandes impliquent le CNRL pour l'analyse microbiologique, SPF pour l'analyse épidémiologique et la DGAI pour les investigations menées concernant l'origine de la contamination alimentaire.

5. ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

Le CNRL a également pour mission la mise à jour et la diffusion des connaissances sur *Listeria* et la listériose

- auprès du grand public, et notamment pour les personnes à risque;
- auprès des professionnels de santé et du secteur agro-alimentaire.

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* dispose d'une collection d'articles papier de 1956 à 2000 sur *Listeria* et un accès aux bases de données en ligne pour les articles de 2000 à nos jours, ainsi qu'une collection d'ouvrages de référence et de données historiques. Les chercheurs, étudiants, praticiens ou hygiénistes qui en font la demande peuvent consulter ce centre de documentation. Chaque année, le CNR procure environ 20-40 documents pour des chercheurs ou praticiens en accompagnement de leur compte-rendu en cas de formes rares ou opérateurs agro-alimentaires.

5.1. CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE

5.1.1. Enseignements, Formations, Accueil de stagiaires

Les membres du CNRL animent chaque année de multiples formations microbiologiques médicales et agro-alimentaires : diplômes universitaires médicaux, formation médicale initiale des obstétriciens et infectiologues, séminaires de formation continue au sein de services hospitalo-universitaires d'Obstétrique, de Médecine Interne ou de Maladies Infectieuses sur différents sujets ayant trait à la listériose.

En 2019 et 2020, Marc Lecuit a encadré des étudiants ou a réalisé les enseignements suivants :

- Cours en M1 et M2 de Microbiologie et Biologie cellulaire, Université Paris, Sorbonne Université, ENS.
- Cours de Maladies infectieuses et Microbiologie, Faculté de Médecine de l'Université de Paris.
- Direction du travail de 2 étudiants en thèses de doctorat et de 6 post-doctorants.
- Participation à la formation RESER pour des biologistes du Réseau international des Instituts Pasteur, Institut Pasteur, 26 novembre 2018, sur « WGS et référence : exemple *Listeria monocytogenes* ».

En 2019 et 2020, Caroline Charlier a encadré des étudiants ou a réalisé les enseignements suivants :

- Cours de Maladies Infectieuses Faculté de Médecine de l'Université de Paris étudiants de DFG3 à DFA3 20H/an.
- Cours Européen de Maladies Infectieuses : étudiants de deuxième cycle de 3 à 6^{ème} année Hamburg, Edinburg, Anvers, Athènes, Rome et Paris : 30H/an.
- Cours de troisième cycle dans 3 DU/ DIU : 10H/an.
- Cours de troisième cycle de DES Maladies Infectieuses et Médecine Générale : 8H/an.
- Cours à l'Institut de Formation en Soins Infirmiers : 4H/an.
- Participation à la formation des techniciens du réseau des Instituts Pasteurs. RESER. Listériose. 1 h en 2019.
- Encadrement de 2 mémoires de sage-femmes.
- Encadrement de 3 thèses d'exercice de médecine.
- Participation au jury de 3 thèses de médecine.
- Conférence invitée à La faculté Catholique de Rome 2019.
- Conférence invitée au collège royal des obstétriciens d'Ecosse 2020.
- Capsule pédagogique sur listériose pour le Groupe Recherche Infections et Grossesse 2020.

Caroline Charlier est membre du conseil de pédagogie de l'UFR médecine de la faculté de santé de l'Université de Paris.

En 2019 et 2020, Alexandre Leclercq a encadré des étudiants ou a réalisé les enseignements suivants :

- participation au comité de thèse d'une doctorante le 31 octobre 2019 du Dr. T. CHERIFI (Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada), sur « l'étude de la diversité, de la persistance et de la formation du biofilm chez les souches de *L. monocytogenes* dans des abattoirs de porc au Québec » sous la direction du Prof. P. Fravalo, pour lequel le CNRL avait expertisé des souches en typage génomique.
- participation au comité de thèse d'une doctorante de l'École Doctorale ABIES (Université Paris-Est) le 17 Décembre 2019, Mme Lena Fritsch, du LNRI sur « Caractérisation de la variabilité intra-spécifique des limites de croissance de *Listeria monocytogenes* à des températures basses et études des mécanismes d'adaptation au froid » sous la direction du Prof. J.C. Augustin (École Vétérinaire de Maisons-Alfort).

En 2020, Alexandra Moura a participé le 15 Octobre 2020 au jury du diplôme de l'Ecole Pratique des hautes Etudes de Madame Claire Yvon (ANSES) sur « Quelle méthode analytique WGS choisir en vue de l'investigation d'évènements sanitaires ? Comparaison d'outils bio-informatiques en vue d'une validation et accréditation de méthode ».

5.1.2. Accueil de stagiaires

En 2019 et 2020, le CNRL a accueilli :

- le Prof. Mauricio Redondo-Solano de la Faculté de Microbiologie, Costa Rica, du 30 septembre au 28 Octobre 2019, pour une formation sur le processus analytique du CNRL et la constitution d'une base de données génomique par cgMLST ;
- le Dr Hsiu-Jung Lo de l'Institut National de Recherche en Santé de Taiwan, du 29 octobre 2018 au 31 août 2019, pour une formation sur le processus analytique et la génomique, création d'une base de données génomiques à Taïwan pour la surveillance des *Listeria* ;
- et participé au programme RESER, réseau d'étude et de surveillance des pathogènes émergents, Institut Pasteur, Paris, France. Stage d'un scientifique de l'Institut Pasteur de Casablanca (Maroc), du 01 au 26 avril 2019 et d'une technicienne de l'Institut Pasteur de Tunis (Tunisie), du 03 au 28 Juin 2019 pour une formation sur ce qu'est un CNR.

5.1.3. Liste des guides élaborés

Leclercq A, Le Monnier A Chapitre 68 : *Listeria monocytogenes*. Référentiel en Microbiologie Médicale (Remic) 2019, Société Française de Microbiologie.

Lecuit M, Charlier C. Listériose. Chapitre 67 Pilly, Edition, 2020.

5.1.4. Diffusion des données de surveillance et des productions du CNR

5.1.4.1. Retro-informations aux partenaires

Le retour d'information prend plusieurs formes :

1. Compte-rendu détaillé des analyses effectuées pour chaque souche envoyée au laboratoire expéditeur. En cas d'atypies sur la souche ou l'observation médicale, le laboratoire expéditeur est contacté par l'un des responsables pour échanges d'informations.
2. Publication des formes atypiques de listérioses.
3. Communications orales à de multiples congrès nationaux et internationaux des travaux de recherche du CNRL (réunion multidisciplinaire de chimiothérapie infectieuse (RICAI) en 2019-2020).

Depuis 2007, le rapport d'activité du CNRL (version web) après sa validation par le comité des CNR est mis en ligne sur notre site web (Adresse <http://www.pasteur.fr/cnr/Listeria> rubrique « actualités-Rapports ») et adressé à tous les institutionnels investis dans la surveillance de la listériose ainsi qu'à toute personne en faisant la demande.

5.1.4.2. Information des professionnels de santé : site internet

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* dispose d'un site internet en français et anglais : (<http://www.pasteur.fr/cnr/Listeria>), qui est incorporé au site des CNR de l'Institut Pasteur formant le LREMS (Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite) et est au minimum actualisé tous les 6 mois ainsi qu'évalué par le COFRAC lors des audits d'accréditation du LREMS.

Il contient des informations sur les missions du CNRL, ses rapports d'activité, la listériose, des recommandations pour les professionnels de santé, les laboratoires (dont les éléments de conseils méthodologiques décrits en annexe B), les opérateurs agro-alimentaires et patients, des liens vers les sites des partenaires du CNRL, et des informations pratiques comme la manière d'envoyer les souches au CNRL (contrat de prestation, feuilles de renseignements).

5.1.5. Activité de conseil aux professionnels de santé

En 2019 et 2020, le CNRL a reçu environ 360 (2019 : 290) demandes d'information par e-mail (listeria@pasteur.fr) (~5 à 7/semaine) et environ 300 (2019 : 470) appels téléphoniques (~5 à 9/semaine) (cf. point 4.7 "Prestations de conseils » de la norme NF EN ISO 15189) et point 4.4. "Revue de contrat » de la norme NF EN ISO 17025). Cette activité de conseils a été évaluée pour la partie médicale par les évaluateurs techniques COFRAC en avril 2019 puis dans les audits internes 2019.

Par ailleurs, de nombreux biologistes et cliniciens ayant participé à l'étude MONALISA sollicitent le CNRL pour des conseils médicaux à propos des patients inclus dans l'étude.

Professionnels de santé

- demandes de renseignements concernant l'envoi de souche
- demandes de conseils microbiologiques (prélèvements biologiques à réaliser, isolement, identification, typage des souches, et/ou interprétation des résultats)
- demandes d'aide au diagnostic (stratégie diagnostic, réalisation d'antibiogramme, diagnostic complémentaire par PCR et/ou sérologie)
- demandes de conseils thérapeutiques (ex : alternative thérapeutique en cas d'allergie aux β -lactamines, d'insuffisance rénale ou de mauvaise tolérance hématologique ou neurologique, conseil pour des infections complexes de type sur matériel étranger ou abcès cérébraux)
- demandes de conseils en cas de crise sanitaire

Professionnels de l'alimentaire

- demandes de renseignements concernant l'envoi de souche et les alertes-produits
- demandes de conseils microbiologiques (prélèvements à réaliser, isolement, identification, typage des souches, et/ou interprétation des résultats)
- information sur la génomique et le cgMLST
- demandes relatives au management de la qualité au CNRL, (procédures et démarches, gestion des non-conformités et/ou erreurs d'aiguillage des souches)
- demandes de conseils en cas de crise sanitaire

Particuliers

- demandes de conseil de femmes enceintes (prévention, aliments à risque)
- demandes de conseils diététiques de personnes présentant des facteurs de risque
- demandes de conseils en cas de crise sanitaire

Scientifiques et étudiants

- demandes de stage de formation
- demandes d'informations et de conseils sur les techniques utilisées au CNRL
- demandes d'article et/ou de documentation sur le genre *Listeria* et sur l'épidémiologie de la listériose

5.2. CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES

Veille Internet

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* est abonné à plusieurs réseaux d'alertes de santé humaine et alimentaire. Les cadres du CNRL participent au Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M) afin de répondre, le cas échéant, à toutes questions spécifiques sur la listériose ou toutes demandes de bibliographie sur ce sujet. Le CNRL répertorie l'ensemble des sites Internet en langue française et sollicite les modifications de données erronées, ajouter des informations ou effectuer un lien avec le site Internet du CNRL. Il effectue également une veille de la consultation des termes *Listeria*/listérioses sur Google trends et Twitter et des nouvelles publications associées à ce terme sur le web pour détecter un phénomène anormal non rapporté et le rapporter à la cellule *Listeria*. Ceci permet de détecter une augmentation atypique sur des termes dans une zone géographique et une période donnée signalant un phénomène anormal.

Expertises dans des comités nationaux, européens ou internationaux

Les responsables du CNRL ont participé, en tant qu'experts ou conseillers, à différentes instances : ECDC groupe *Listeria*, groupe de travail permanent de la Coordination des Laboratoires de Référence et d'Expertise (Institut Pasteur), Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M), Comité Européen de Normalisation en microbiologie de la chaîne alimentaire CEN TC463, Comité français Afnor V08B, Comité International de normalisation en microbiologie des aliments ISO TC34/SC9, Comité d'experts spécialisés CES « BIORISK » de l'ANSES (jusqu'en avril 2019), groupes d'experts ANSES en 2019 sur « l'attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire » et groupe d'experts JEMRA FAO/OMS comme décrit précédemment.

Conseil auprès de Ministères

Par sa participation à la cellule *Listeria*, le CNRL est en contact presque quotidien avec les services concernés de Santé Publique France (Ministère de la Santé), de la DGAL (Ministère de l'Agriculture) et de la DGCCRF (Ministère de l'Économie).

Conseil auprès de l'ECDC, la FAO, l'OMS

Le CNRL participe avec SPF et les Ministères concernés, aux réponses aux demandes émises par les systèmes EPIS, RASFF, INFOSAN sur des épidémies, des cas groupés ou des produits alimentaires contaminés. Le CNRL participe aux réunions et à la rédaction de documents de l'ECDC et de l'OMS sur *Listeria*, et le laboratoire héberge le CCOMS *Listeria*.

5.3. CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC, ETC.)

Expertise de méthodes ou de déclarations d'invention ou de projets industriels

En 2019-2020, les responsables du CNRL ont participé aux réunions concernant l'application des normes françaises, européennes et internationales pour les *Listeria* en microbiologie de la chaîne alimentaire.

Expertise de publications et de projets scientifiques

En 2019 et 2020, le CNRL a participé à l'examen d'articles dans des journaux nationaux et internationaux à comités de lecture (*New England Journal of Medicine*, *PLOS One*, *PLOS pathogens*, *Frontiers in Microbiology*, *Frontiers in Veterinary Science*, *Epidemiology and Infection*, *Science Reports*, *Clinical Microbiology and Infection*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *International Journal of Food Microbiology*, *Emergence Microbes & Infections*, *Foodborne Pathogens and Disease*, *Genes*, *Food Research International*, *International Journal of Infectious Diseases*, *Journal of Food Protection*, *Letter Applied Microbiology*, *Revue de Médecine interne*). Il a également expertisé des projets scientifiques.

M. Lecuit est membre du comité éditorial de « Virulence », C. Charlier est éditeur pour la section « Maladies Infectieuses » de la Presse médicale, et A. Leclercq est membre du comité éditorial de « Journal of Food Protection », « Food Analytical methods », « International Journal of Food Microbiology », « Frontier Microbiology ».

Expertise d'articles du Bulletin de veille de la Plateforme de surveillance de la chaîne alimentaire (DGAI)

Expertise ou avis sur des articles sur *Listeria* pour V. AUVIGNE, DGAI, du Bulletin de veille sanitaire internationale de la plateforme SCA (<https://www.plateforme-sca.fr/>).

Expertise (Citation) pour des medias

Marc Lecuit. Une femme enceinte perd son bébé, contaminé à la listériose, Le Parisien, 27/05/19.

<http://www.leparisien.fr/seine-et-marne-77/listeria-dans-le-fromage-de-la-brie-une-deuxieme-victime-recensee-27-05-2019-8081193.php>

6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNRL

Le CNRL développe son expertise microbiologique en lien avec l'Unité de Biologie des Infections qui l'héberge à l'Institut Pasteur. Ceci permet de développer des projets de recherche à l'interface entre les activités de surveillance du CNRL et les activités de recherche fondamentale de l'Unité.

Chaque année, l'Institut Pasteur attribue un budget propre au CNRL et au CCOMS en complément de celui octroyé par SPF pour le CNRL. Outre son utilisation pour le financement de personnels, d'équipements et de frais de fonctionnement, ce budget permet de développer des projets de recherche qui sont à l'interface entre les activités de surveillance du CNR et les activités de recherche de l'Unité.

Les paragraphes en anglais correspondent soit aux résumés des publications, soit aux actes de colloques non disponibles sur le web.

6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS EN 2019-2020

6.1.1. Contributions aux études épidémiologiques, microbiologiques et cliniques

Outbreak of listeriosis in South Africa associated with processed meat

En collaboration avec le Dr J. Thomas, NICD, Johannesburg, Afrique du Sud

*Article publié : Thomas J, Govender N, McCarthy KM, Erasmus LK, Doyle TJ, Allam M, Ismail A, Ramalwa N, Sekwadi P, Ntshoe G, Shonhiwa A, Essel V, Tau N, Smouse S, Ngomane HM, Disenyeng B, Page NA, Govender NP, Duse AG, Stewart R, Thomas T, Mahoney D, Tourdjman M, Disson O, Thouvenot P, Maury MM, Leclercq A, Lecuit M, Smith AM, Blumberg LH. Outbreak of Listeriosis in South Africa Associated with Processed Meat. *N Engl J Med*. 2020 Feb 13;382(7):632-643. (47)*

Abstract:

BACKGROUND: An outbreak of listeriosis was identified in South Africa in 2017. The source was unknown.

METHODS: We conducted epidemiologic, trace-back, and environmental investigations and used whole-genome sequencing to type *Listeria monocytogenes* isolates. A case was defined as laboratory-confirmed *L. monocytogenes* infection during the period from June 11, 2017, to April 7, 2018.

RESULTS: A total of 937 cases were identified, of which 465 (50%) were associated with pregnancy; 406 of the pregnancy-associated cases (87%) occurred in neonates. Of the 937 cases, 229 (24%) occurred in patients 15 to 49 years of age (excluding those who were pregnant). Among the patients in whom human immunodeficiency virus (HIV) status was known, 38% of those with pregnancy-associated cases (77 of 204) and 46% of the remaining patients (97 of 211) were infected with HIV. Among 728 patients with a known outcome, 193 (27%) died. Clinical isolates from 609 patients were sequenced, and 567 (93%) were identified as sequence type 6 (ST6). In a case-control analysis, patients with ST6 infections were more likely to have eaten polony (a ready-to-eat processed meat) than those with non-ST6 infections (odds ratio, 8.55; 95% confidence interval, 1.66 to 43.35). Polony and environmental samples also yielded ST6 isolates, which, together with the isolates from the patients, belonged to the same core-genome multilocus sequence typing cluster with no more than 4 allelic differences; these findings showed that polony produced at a single facility was the outbreak source. A recall of ready-to-eat processed meat products from this facility was associated with a rapid decline in the incidence of *L. monocytogenes* ST6 infections.

CONCLUSIONS: This investigation showed that in a middle-income country with a high prevalence of HIV infection, *L. monocytogenes* caused disproportionate illness among pregnant girls and women and HIV-infected persons. Whole-genome sequencing facilitated the detection of the outbreak and guided the trace-back investigations that led to the identification of the source.

Whole-genome sequencing-based characterization of 100 *Listeria monocytogenes* isolates collected from food processing environments over a four-year period

En collaboration avec Dr S. Fanning, University College, Dublin, Ireland

Article publié: Hurley D, Luque-Sastre L, Parker CT, Huynh S, Eshwar AK, Nguyen SV, Andrews N, Moura A, Fox EM, Jordan K, Lehner A, Stephan R, Fanning S. Whole-Genome Sequencing-Based Characterization of 100 *Listeria monocytogenes* Isolates Collected from Food Processing Environments over a Four-Year Period. *mSphere*. 2019 Aug 7;4(4). (48).

Abstract: *Listeria monocytogenes* is frequently found in foods and processing facilities, where it can persist, creating concerns for the food industry. Its ability to survive under a wide range of environmental conditions enhances the potential for cross-contamination of the final food products, leading to possible outbreaks of listeriosis. In this study, whole-genome sequencing (WGS) was applied as a tool to characterize and track 100 *L. monocytogenes* isolates collected from three food processing environments. These WGS data from environmental and food isolates were analyzed to (i) assess the genomic diversity of *L. monocytogenes*, (ii) identify possible source(s) of contamination, cross-contamination routes, and persistence, (iii) detect absence/presence of antimicrobial resistance-encoding genes, (iv) assess virulence genotypes, and (v) explore *in vivo* pathogenicity of selected *L. monocytogenes* isolates carrying different virulence genotypes. The predominant *L. monocytogenes* sublineages (SLs) identified were SL101 (21%), SL9 (17%), SL121 (12%), and SL5 (12%). Benzalkonium chloride (BC) tolerance-encoding genes were found in 62% of these isolates, a value that increased to 73% among putative persistent subgroups. The most prevalent gene was *emrC* followed by *bcrABC*, *qacH-Tn6188*, and *qacC*. The *L. monocytogenes* major virulence factor *inlA* was truncated in 31% of the isolates, and only one environmental isolate (*L. monocytogenes* CFS086) harbored all major virulence factors, including *Listeria* pathogenicity island 4 (LIPI-4), which has been shown to confer hypervirulence. A zebrafish embryo infection model showed a low (3%) embryo survival rate for all putatively hypervirulent *L. monocytogenes* isolates assayed. Higher embryo survival rates were observed following infection with unknown virulence potential (20%) and putatively hypovirulent (53 to 83%) *L. monocytogenes* isolates showing predicted pathogenic phenotypes inferred from virulence genotypes.

IMPORTANCE: This study extends current understanding of the genetic diversity among *L. monocytogenes* from various food products and food processing environments. Application of WGS-based strategies facilitated tracking of this pathogen of importance to human health along the production chain while providing insights into the pathogenic potential for some of the *L. monocytogenes* isolates recovered. These analyses enabled the grouping of selected isolates into three putative virulence categories according to their genotypes along with informing selection for phenotypic assessment of their pathogenicity using the zebrafish embryo infection model. It has also facilitated the identification of those isolates with genes conferring tolerance to commercially used biocides. Findings from this study highlight the potential for the application of WGS as a proactive tool to support food safety controls as applied to *L. monocytogenes*.

LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe.

En collaboration avec T.J. Dallman, Public Health England, London, UK

Article publié: Painset A, Björkman JT, Kiil K, Guillier L, Mariet JF, Félix B, Amar C, Rotariu O, Roussel S, Perez-Reche F, Brisse S, Moura A, Lecuit M, Forbes K, Strachan N, Grant K, Møller-Nielsen E, Dallman TJ. LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe. *Microb Genom*. 2019 Feb; 5(2) (49).

Abstract: We present the LiSEQ (*Listeria* SEQuencing) project, funded by the European Food Safety Agency (EFSA) to compare *Listeria monocytogenes* isolates collected in the European Union from ready-to-eat foods, compartments along the food chain (e.g. food-producing animals, food-processing environments) and humans. In this article, we report the molecular characterization of a selection of this data set employing whole-genome sequencing analysis. We present an overview of the strain diversity observed in different sampled sources, and characterize the isolates based on their virulence and resistance profile. We integrate into our analysis the global *L. monocytogenes* genome collection described by Moura and colleagues in 2016 to assess the representativeness of the LiSEQ collection in the context of known *L. monocytogenes* strain diversity.

Exceptionally large and country-wide outbreak of invasive listeriosis associated with blood sausage consumption, Germany 2018-2019.

En collaboration avec le Dr S. Halbedel, Robert Koch Institute Wernigerode Branch, Allemagne

Article publié online dans EID: Halbedel S, Wilking H, Holzer A, Kleta S, Fischer MA, Lüth S, Pietzka A, Huhulescu S, Lachmann R, Krings A, Ruppitsch W, Leclercq A, Kamphausen R, Meincke M, Wagner-Wiening C, Contzen M, Kraemer IB, Al Dahouk S, Allerberger F, Stark K, Flieger A. 2020. Large Nationwide Outbreak of Invasive Listeriosis Associated with Blood Sausage, Germany, 2018-2019. *Emerg Infect Dis.* 2020 Jul;26(7):1456-1464. (50)

Abstract: Invasive listeriosis is a severe food-borne infection in humans with increasing incidence world-wide. The disease is difficult to control from the public health perspective, but molecular surveillance programs have been implemented by different countries for improving recognition and management of listeriosis outbreaks. Routine whole genome sequencing (WGS), core genome multi locus sequence typing (cgMLST) and single nucleotide polymorphism (SNP) calling were used for subtyping of *L. monocytogenes* isolates from listeriosis cases and suspected 56 foods in Germany. This identified an unusually large cluster of *L. monocytogenes* isolates with 134 highly clonal, benzalkonium-resistant ST6 isolates collected in 2018-2019 and allocated to 112 notified listeriosis cases. Epidemiological investigations identified blood sausage as the outbreak vehicle, which was contaminated with isolates highly related to the clinical isolates. Withdrawal of the product from the market ended the outbreak. This cluster represents one of the 61 largest European outbreaks of invasive listeriosis in the last 25 years.

Un cas français lors de cette épidémie a permis de participer à l'identification de la source de cette épidémie.

GWAS des souches de *L. monocytogenes* d'origine alimentaire et clinique.

En collaboration avec F. Laporte, R. Chiki et H. Aschard (Department of Computational Biology-USR 3756 CNRS, Institut Pasteur) et L. Quintana-Murci (Department of Genomes and Genetics, Institut Pasteur)

Présentation à European Human Genetics Conference, Berlin, Allemagne, 6-9 Juin 2020 (SHG-2020) : F. Laporte, M. Maury, E Patin, A Leclercq, L Quintana-Murci, R. Chiki, M. Lecuit, H. Aschard. A GWAS of *Listeria monocytogenes* strains of food and clinical origins.

Abstract:

Introduction: Genome-wide Association Studies (GWAS) have been central to identify genetic variations associated with complex human phenotypes. There is now tremendous interest for implementing GWAS-like approach to genomes of pathogenic bacteria in order to advance our understanding of infectious diseases. However, bacterial genomes harbour complex structure and long-range linkage disequilibrium (LD), making such analyses extremely challenging. Here, we aim at identifying genetic variation in *Listeria monocytogenes* associated with food versus clinical sources using whole genome sequencing of 3718 strains of food and clinical origins collected in the context of surveillance of *Listeria* in France.

Materials and Methods: We used both real and simulated data to assess the performances of various GWAS approaches, including existing software such as DBGwas and PySeer. First, we considered SNPs derived from the core genome, and unitigs derived from compacted De Bruijn Graph nodes. Second, we compared alternative *ad hoc* algorithms for deriving pairwise genetic relatedness between strain. Third, we assessed a range of logistic and linear mixed models (LMM) with various random effect. And fourth, we assessed solutions to account for the observed extensive LD.

Results & conclusion: We identified multiple critical issues in existing approaches, resulting in invalid GWAS results in our data. We developed solutions for each of those issues, implementing an adaptive inference of relatedness between strains, a stepwise LMM model selection, and a genome LD correction inspired from human GWAS. The developed and validated approach show promising results in the current set of *Listeria monocytogenes* collected prospectively.

Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated From Ready-to-Eat Meat and Meat Processing Environments in Poland

En collaboration avec Dr M. Kurpas, National Veterinary Research Institute, Pulawy, Pologne.

Article publié: Kurpas M, Osek J, Moura A, Leclercq A, Lecuit M, Wieczorek K. Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated From Ready-to-Eat Meat and Meat Processing Environments in Poland. *Front Microbiol.* 2020 Jun 25;11:1412. (51)

Abstract:

Listeria monocytogenes is one of the major foodborne pathogens. Isolates of PCR-serogroups IIb ($n = 17$) and IVb ($n = 31$) recovered from food ($n = 33$) and food processing environment ($n = 15$) in Poland were characterized using whole genome sequencing. Most isolates belonged to Multi-Locus Sequence Type (MLST) ST2 (31.3%) and ST5 (22.9%). Core genome MLST (cgMLST) analysis classified isolates into seven sublineages (SL) and 25 different cgMLST types (CT). Consistent with the MLST results, most sublineages were SL2 and SL5. Eleven isolates harbored *aacA4* encoding resistance to aminoglycosides, three isolates harbored *emrC* ($n = 3$) and one *brcABC* ($n = 1$) encoding tolerance to benzalkonium chloride. Isolates belonging to SL5 CT2323 carried a so far unreported *inlB* allele with a deletion of 141 nucleotides encoding the β -repeat sheet and partially the GW1 domain of InlB. Comparison with publicly available genome sequences from *L. monocytogenes* isolated from human listeriosis cases in Poland from 2004 to 2013 revealed five common CTs, suggesting a possible epidemiological link with these strains. The present study contributes to characterize the diversity of *L. monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) meat and meat processing environments in Poland and unravels previously unnoticed links with clinical cases in Europe.

Genome sequence of *Listeria innocua* strain MEZLIS26, isolated from a goat in South Africa

En collaboration avec le Dr ME El Zowalaty, University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa

Article publié: El Zowalaty ME, Hickman RA, Moura A, Lecuit M, Zishiri OT, Noyes N, Järhult JD. Genome Sequence of *Listeria innocua* Strain MEZLIS26, Isolated from a Goat in South Africa. *Microbiol Resour Announc.* 2019 Oct 31;8(44). (52).

Abstract: Here, we report the draft genome sequence of *Listeria innocua* strain MEZLIS26, isolated from a healthy goat in Flagstaff, Eastern Cape Province, South Africa. The genome was sequenced using the Illumina MiSeq platform and had a length of 2,800,777 bp, with a G+C content of 37.4%, 2,755 coding DNA sequences (CDSs), 49 transfer RNAs (tRNAs), and 4 noncoding RNAs (ncRNAs).

6.1.2. Etudes cliniques

Causes of fever in pregnant women with acute undifferentiated fever: a prospective multicentric study

Article: Charlier C, Perrodeau E, Levallois C, Cachina T, Dommergues M, Salomon LJ, Azria E, Goffinet F, Ravaut P, Lecuit M. Causes of fever in pregnant women with acute undifferentiated fever: a prospective multicentric study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020 Jan 18. doi: 10.1007/s10096-019-03809-3. (53).

Abstract: The etiologies of undifferentiated fever in pregnant women have not been studied thoroughly. Because of its non-specific presentation but severe prognosis, listeriosis is often suspected in this setting, but in most cases not confirmed. We studied the causes of undifferentiated fever in pregnant women who received preemptive listeriosis treatment. We conducted from November 1, 2011, to June 30, 2013, a prospective multicentric observational cohort study of pregnant women referred to obstetrical wards with undifferentiated fever and who received listeriosis preemptive treatment. Clinical and biological features, treatment, outcome, and final diagnosis were collected. We enrolled 103 febrile pregnant women. A cause was identified in 77/103 (75%): viral infection in 52/103 (50%, influenza in 21 (20%)), bacterial infection in 22 (21%, including 16 pyelonephritis (16%) and 3 pneumonias (3%)), and TORCH infection in 3 (3%, varicella, toxoplasmosis, and cytomegalovirus primo-infections, $n=1$, each). Viral infections collected during influenza outbreaks (December-March) accounted for 43/57 (75%) cases. Two fetal losses were reported in the context of febrile pneumonia. Final diagnoses required adapting medical care in 46/77 (60%) of cases,

for bacterial, influenza, or TORCH infections. A large array of benign to potentially severe infections manifests as acute undifferentiated fever in pregnant women, requiring careful repeated evaluation.

Community-acquired bacterial meningitis in adults: in-hospital prognosis, long term disability and determinants of outcome in a multicenter prospective cohort

Personnes impliquées au CNRL dans l'étude COMBAT pour l'encodage des Case Report Form des 32 cas de listériose et pour la participation aux analyses (A. Leclercq, C. Charlier, M. Lecuit)

Article : Tubiana S, Varon E, Biron C, Ploy MC, Mourvillier B, Taha MK, Revest M, Poyart C, Martin-Blondel G, Lecuit M, Cua E, Pasquet B, Preau M, Hoen B, Duval X; COMBAT study group; Principal investigator; Steering Committee; Scientific committee: steering committee and the following members; COMBAT Clinical Centers; Coordination and statistical analyses (Clinical trial unit, Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine, AP-HP, Paris); Scientific partnership; Partners. Community-acquired bacterial meningitis in adults: in-hospital prognosis, long term disability and determinants of outcome in a multicentre prospective cohort. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Jan 9. pii:S1198-743X(19)30679-2. (54).

Abstract:

OBJECTIVES: To identify factors associated with unfavorable in-hospital outcome (death or disability) in adults with community-acquired bacterial meningitis (CABM).

METHODS: In a prospective multicenter cohort study (COMBAT; February 2013-July 2015), all consecutive cases of CABM in the 69 participating centers in France were enrolled and followed up for 12 months. Factors associated with unfavorable outcome were identified by logistic regression and long-term disability analyzed.

RESULTS: Among the 533 enrolled patients, (*S. pneumoniae* 53.8% (280/520 isolates identified), *N. meningitidis* 21.3% (111/520), others 24.9% (129/520)), case fatality rate was 16.9% (90/533) and unfavorable outcome occurred in 45.0% (225/500). Factors independently associated with unfavorable outcome were: age > 70 years (aOR=4.64; 95%CI [1.93-11.15]), male gender (aOR=2.11; [1.25-3.57]), chronic renal failure (aOR=6.65; [1.57-28.12]), purpura fulminans (aOR=4.37; [1.38-13.81]), localized neurological signs (aOR=3.72; [2.29-6.05]), disseminated intravascular coagulation (aOR=3.19; [1.16-8.79]), cerebrospinal fluid (CSF) white-cell count < 1500 cells/ μ L (aOR=2.40; [1.42-4.03]), CSF glucose concentration (0.1-2.5g/L: aOR=1.92; [1.01-3.67]; <0.1g/L: aOR=2.24; [1.01-4.97]), elevated CSF protein concentration (aOR=1.09; [1.03-1.17]), time interval between hospitalization and lumbar puncture > 1 day (aOR=2.94; [1.32-6.54]), and *S. pneumoniae* meningitis (aOR=4.99; [1.98-12.56]), or meningitis other than *N. meningitidis* (aOR=4.54; [1.68-12.27]). At twelve months, 26.7% (74/277) had hearing loss, 32.8% (87/265) depressive symptoms, 31.0% (86/277) persistent headache, and 53.4% had a Physical HRQL (142/266) < 25th percentile of the distribution of the score in the general French population (p<0.0001).

CONCLUSIONS: The burden of CABM (death, disability, depression, impaired quality of life, and hearing loss) is high. Identification of cases from the first symptoms may improve prognosis.

CLINICALTRIAL: Gov identification number: NCT01730690.

A 5-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a randomized clinical trial

Collaboration dans le cadre d'expertises de selles de patients pour la detection de Listeria monocytogenes viables dans le cadre du projet R-GNOSIS.

Article publié: Huttner BD, de Lastours V, Wassenberg M, Maharshak N, Mauris A, Galperine T, Zanichelli V, Kapel N, Bellanger A, Olearo F, Duval X, Armand-Lefevre L, Carmeli Y, Bonten M, Fantin B, Harbarth S; R-Gnosis WP3 study group. A 5-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Jul; 25(7):830-838. (55)

Abstract:

OBJECTIVES: Intestinal carriage with extended spectrum β -lactamase *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) can persist for months. We aimed to evaluate whether oral antibiotics followed by faecal microbiota transplantation (FMT) can eradicate intestinal carriage with ESBL-E/CPE.

METHODS: Randomized, open-label, superiority trial in four tertiary-care centres (Geneva (G), Paris (P), Utrecht (U), Tel Aviv (T)). Non-immunocompromised adult patients were randomized 1: 1 to either no intervention (control) or a 5-day course of oral antibiotics (colistin sulphate 2×10^6 IU 4x/day; neomycin sulphate 500 mg 4x/day) followed by frozen FMT obtained from unrelated healthy donors. The primary outcome was detectable intestinal carriage of ESBL-E/CPE by stool culture 35-48 days after randomization (V4). ClinicalTrials.gov [NCT02472600](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02472600). The trial was funded by the European Commission (FP7).

RESULTS: Thirty-nine patients (G = 14; P = 16; U = 7; T = 2) colonized by ESBL-E (n = 36) and/or CPE (n = 11) were enrolled between February 2016 and June 2017. In the intention-to-treat analysis 9/22 (41%) patients assigned to the intervention arm were negative for ESBL-E/CPE at V4 (1/22 not receiving the intervention imputed as positive) whereas in the control arm 5/17 (29%) patients were negative (one lost to follow up imputed as negative) resulting in an OR for decolonization success of 1.7 (95% CI 0.4-6.4). Study drugs were well tolerated overall but three patients in the intervention group prematurely stopped the study antibiotics because of diarrhoea (all received FMT).

CONCLUSIONS: Non-absorbable antibiotics followed by FMT slightly decreased ESBL-E/CPE carriage compared with controls; this difference was not statistically significant, potentially due to early trial termination. Further clinical investigations seem warranted.

Listeria monocytogenes-associated endovascular infections: a study of 71 consecutive cases

En collaboration avec les biologistes et cliniciens ayant gérés les cas décrits et rapportés au CNRL.

Article publié : Shoai-Tehrani M, Pilmis B, Maury MM, Robineau O, Disson O, Jouvion G, Couplier G, Thouvenot P, Bracq-Dieye H, Valès G, Leclercq A, Lecuit M, Charlier C; Listeria endovascular infections study group. Listeria monocytogenes-associated endovascular infections: A study of 71 consecutive cases. J Infect. 2019 Oct;79(4):322-331. (22).

Abstract:

BACKGROUND: *Listeria monocytogenes*-associated endovascular infections are not well characterized.

METHODS: Retrospective study of 71 culture-proven cases reported to the French National Reference Center for *Listeria* from 1993 to 2018.

RESULTS: Seventy-one cases were identified: 42 with vascular aneurysms/prosthetic infections, 27 with endocarditis, 2 with both. Fifty-eight were men (82%); median age was 75 years [46-92]; 93% reported co-morbidities (66/71), including 50% with immunosuppressive conditions. Vascular infections consisted of infected aneurysms (68%) or prosthetic graft infections (32%); vascular rupture was reported in 25/42 (60%). Tissue samples grew *L. monocytogenes* in 98% (43/44) and blood cultures in 64% (27/42). Endocarditis cases involved prosthetic or native valves or intracardiac devices in respectively 62% (18/29), 28% (8/29) and 10% (3/29). Infected valves were aortic (62%, 16/26), mitral (31%, 8/26) or both (8%, 2/26); 38% patients required surgery; 45% displayed heart failure; 17% had concomitant neurolisteriosis. In-hospital mortality in vascular infections was 12% (5/42) and 41% (12/29) for Lm-associated endocarditis.

CONCLUSIONS: Endovascular listeriosis is a rare but severe infection. It manifests as vascular infections and endocarditis, mostly in older patients with vascular or cardiac valve prosthetic devices and co-morbidities. Mortality in Lm-associated endocarditis is twice higher than with other pathogens, requiring prompt recognition and treatment.

Cutaneous listeriosis, a case series of 16 consecutive patients over 25 years

En collaboration avec les biologistes et cliniciens ayant gérés les cas décrits et rapportés au CNRL.

Cette étude permettra son référencement dans les fiches ANSES et DGAI sur la listériose et les risques professionnels puisqu'aucune étude sur cette forme n'avait été réalisée à ce jour en France.

Article publié : Pilmis B, Leclercq A, Maury MM, Moura A, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Valès G, Lecuit M, Charlier C; cutaneous listeriosis study group. Cutaneous listeriosis, a case series of 16 consecutive patients over 25 years. J Infect. 2020 Feb;80(2):232-254. (21).

Abstract: Sur 7294 cas humains collectés entre 1994 et 2018 en France, 16 impliquaient des patients atteints d'infections cutanées / des tissus mous associés à *Listeria* (0,2%). Parmi eux, 11 (11/16, 69%) étaient des hommes. L'âge médian était de 62 ans (extrêmes : 8 - 93); 4 patients (4/16, 25%) avaient plus de 80 ans. Seuls 5 patients ont signalé une comorbidité immunosuppressive (cancer du poumon (n = 2), cirrhose (n = 1), diabète sucré (n = 1),

traitement au rituximab (n = 1)) (5/16, 31%). Les lésions consistaient en abcès cutanés simples (n = 11), cellulite (n = 3) ou lésions nodulaires uniques (n = 2). Trois patients ont signalé de la fièvre (3/16, 19%). Les lésions cutanées concernaient les jambes (n = 7/15, 47%), les bras / mains (n = 5/15, 33%) ou le visage (n = 3/15, 20%). Lors de l'exécution (n = 5), toutes les hémocultures étaient négatives. Aucun patient n'a signalé d'autre localisation de *Listeria*, en particulier aucune neurolistériose ou gastro-entérite concomitante. L'exposition à l'environnement n'a été signalée que chez un seul fermier. Aucun autre patient n'a signalé de contact avec des animaux, des fermes, du foin ou de l'ensilage contaminé. Aucune abrasion cutanée préexistante n'a été signalée. *Lm* a été cultivé à partir d'échantillons de peau dans 15 cas. *Listeria seeligeri* a été identifiée dans un cas.

Maternal-fetal infections: Why do they matter?

Editorial publié: Charlier C, Lecuit M. Maternal-fetal infections: Why do they matter? *Virulence*. 2020 Dec;11(1):398-399

Maternal-neonatal listeriosis

Article publié: Charlier C, Disson O, Lecuit M. Maternal-neonatal listeriosis. *Virulence*. 2020 Dec;11(1):391-397. (56)

Abstract: Listeriosis is a rare and severe foodborne infection caused by *Listeria monocytogenes*. It manifests as septicemia, neurolisteriosis, and maternal-fetal infection. In pregnancy, it may cause maternal fever, premature delivery, fetal loss, neonatal systemic and central nervous system infections. Maternal listeriosis is mostly reported during the 2nd and 3rd trimester of pregnancy, as sporadic cases or in the context of outbreaks. Strains belonging to clonal complexes 1, 4 and 6, referred to as hypervirulent, are the most associated to maternal-neonatal infections. Here we review the clinical, pathophysiological, and microbiological features of maternal-neonatal listeriosis.

Neonatal listeriosis presentation and outcome: a prospective study of 189 cases

En collaboration avec les biologistes et cliniciens ayant gérés les cas décrits et rapportés au CNRL.

Article publié : Charlier C, Kermorvant-Duchemin E, Perrodeau E, Moura A, Maury MM, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Valès G, Leclercq A, Ravaut P, Lecuit M; neonatal MONALISA study group. Neonatal listeriosis presentation and outcome: a prospective study of 189 cases. *Clin Infect Dis*. 2021 Apr 20:ciab337. (57)

Abstract:

Context: Listeriosis is caused by the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. It can present as a maternal-neonatal infection. We implemented the nationwide prospective cohort MONALISA and analyzed the features of neonatal listeriosis.

Methods: We studied all neonates born alive from mothers with microbiologically-proven maternal-neonatal listeriosis enrolled from November 2009 to December 2017. We analyzed presentation, neonatal outcome at discharge and predictors of severe presentation and outcome. The study is registered at clinicaltrials.gov (NCT01520597).

Results: We studied 189 infants. 133/189 (70%) had abnormal clinical status at birth, including acute respiratory distress in 106/189 (56%). 132/189 (70%) infants developed early-onset listeriosis and 12/189 (6%) late onset listeriosis who all presented with acute meningitis. 17/189 (9%) had major adverse outcomes: 3% death (5/189), 6% (12/189) severe brain injury, 2% (3/189) severe bronchopulmonary dysplasia, 15/17 in infants born < 34 weeks of gestation ($p < 0.0001$ versus infants born ≥ 34 weeks of gestation). Maternal antimicrobial treatment ≥ 1 day before delivery was associated with a significant decrease of infants' severity (resulting in significantly less inotropic drugs, fluid resuscitation, or mechanical ventilation requirement), OR 0.23 [95% confidence interval CI 0.09-0.51], $p < 0.0001$).

Conclusion: Antenatal maternal antimicrobial treatment is associated with reduced neonatal listeriosis severity, justifying the prescription of preemptive maternal antimicrobial therapy when maternal-fetal listeriosis is suspected. Neonatal outcome is better than reported earlier, and its major determinant is gestational age at birth.

6.1.3. Etudes de la virulence

Hypervirulent Listeria monocytogenes clones' adaptation to the mammalian gut accounts for their association with dairy products

En collaboration avec S. Brisse (Unité Biodiversité et Epidémiologie des bactéries pathogènes)

Article publié: Maury MM, Bracq-Dieye H, Huang L, Vales G, Lavina M, Thouvenot P, Disson O, Leclercq A, Brisse S, Lecuit M. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaptation to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat Commun.* 2019 Jun 6;10(1):2488. (29).

Abstract: *Listeria monocytogenes* (Lm) is a major human and animal foodborne pathogen. Here we show that hypervirulent Lm clones, particularly CC1, are strongly associated with dairy products, whereas hypovirulent clones, CC9 and CC121, are associated with meat products. Clone adaptation to distinct ecological niches and/or different food products contamination routes may account for this uneven distribution. Indeed, hypervirulent clones colonize better the intestinal lumen and invade more intestinal tissues than hypovirulent ones, reflecting their adaptation to host environment. Conversely, hypovirulent clones are adapted to food processing environments, with a higher prevalence of stress resistance and benzalkonium chloride tolerance genes and a higher survival and biofilm formation capacity in presence of sub-lethal benzalkonium chloride concentrations. Lm virulence heterogeneity therefore reflects the diversity of the ecological niches in which it evolves. These results also have important public health implications and may help in reducing food contamination and improving food consumption recommendations to at-risk populations.

Residual variation intolerance score detects loci under selection in neuroinvasive Listeria monocytogenes

En collaboration avec le Dr D. van de Beek (Department of Neurology, Amsterdam Neuroscience, Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Amsterdam, Hollande)

Article publié: Ferwerda B, Maury MM, Brouwer MC, Hafner L, van der Ende A, Bentley S, Lecuit M, van de Beek D. Residual Variation Intolerance Score Detects Loci Under Selection in Neuroinvasive *Listeria monocytogenes*. *Front Microbiol.* 2019 Nov 26; 10:2702. (58).

Abstract: *Listeria monocytogenes* is a Gram-positive bacterium that can be found in a broad range of environments, including soil, food, animals, and humans. *L. monocytogenes* can cause a foodborne disease manifesting as sepsis and meningo-encephalitis. To evaluate signals of selection within the core genome of neuroinvasive *L. monocytogenes* strains, we sequenced 122 *L. monocytogenes* strains from cerebrospinal fluid (CSF) of Dutch meningitis patients and performed a genome-wide analysis using Tajima's D and ω (dN/dS). We also evaluated the residual variation intolerance score (RVIS), a computationally less demanding methodology, to identify loci under selection. Results show that the large genetic distance between the listerial lineages influences the Tajima's D and ω (dN/dS) outcome. Within genetic lineages we detected signals of selection in 6 of 2327 loci (<1%), which were replicated in an external cohort of 105 listerial CSF isolates from France. Functions of identified loci under selection were within metabolism pathways (*Imo2476*, encoding aldose 1-epimerase), putative antimicrobial resistance mechanisms (*Imo1855*, encoding PBPD3), and virulence factors (*Imo0549*, internalin-like protein; *Imo1482*, encoding comEC). RVIS over the two genetic lineages showed signals of selection in internalin-like proteins loci potentially involved in pathogen-host interaction (*Imo0549*, *Imo0610*, and *Imo1290*). Our results show that RVIS can be used to detect bacterial loci under selection.

Listeria monocytogenes, a model in infection biology

Article publié: Lecuit M. *Listeria monocytogenes, a model in infection biology*. *Cell Microbiol.* 2020 Apr;22(4):e13186. (51)

Abstract: *Listeria monocytogenes* causes listeriosis, a systemic infection which manifests as bacteremia, often complicated by meningoencephalitis in immunocompromised individuals and the elderly, and fetal-placental infection in pregnant women. It has emerged over the past decades as a major foodborne pathogen, responsible for numerous outbreaks in Western countries, and more recently in Africa. *L. monocytogenes* pathogenic properties have been studied in detail, thanks to concomitant advances in biological sciences, in particular molecular biology, cell biology and immunology. *L. monocytogenes* has also been instrumental to basic advances in life sciences. *L. monocytogenes* therefore stands both a tool to understand biology and a model in infection biology. This review briefly summarises the clinical and some of the pathophysiological features of listeriosis. In the context of this special issue, it highlights some of the major discoveries made by Pascale Cossart in the fields of molecular and cellular microbiology since the mid-eighties regarding the identification and characterisation of multiple bacterial and host factors critical to *L. monocytogenes* pathogenicity. It also briefly summarises some of the key findings from our laboratory on this topic over the past years.

Atypical hemolytic Listeria innocua are virulent, albeit less than Listeria monocytogenes.

En collaboration avec Dr R. Stephan, Institute for Food safety and Hygiene, Zurich, Suisse.

Article publié: Moura A, Disson O, Lavina M, Thouvenot P, Huang L, Leclercq A, Fredriksson-Ahomaa M, Eshwar AK, Stephan R, Lecuit M. *Atypical hemolytic Listeria innocua are virulent, albeit less than Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 2019 Jan 22. pii: IAI.00758-18 (59).

Abstract: *Listeria innocua* is considered as a non-pathogenic *Listeria* species. Natural atypical hemolytic *L. innocua* have been reported, but have not been characterized in detail. Here we report the genomic and functional characterization of isolates representatives from the two-known natural hemolytic *L. innocua* clades. Whole genome sequencing confirmed the presence of *Listeria* pathogenicity islands (LIPI) characteristic of *Listeria monocytogenes* species. Functional assays showed that LIPI-1 and inIA genes are transcribed, and the corresponding gene products expressed and functional. Using in vitro and in vivo assays, we show that atypical hemolytic *L. innocua* are virulent, can actively cross the intestinal epithelium and spread systemically to the liver and spleen, albeit to a lower degree than the reference *L. monocytogenes* EGDc strain. Although human exposure to hemolytic *L. innocua* is likely rare, these findings are important for food safety and public health. The presence of virulent traits in some *L. innocua* clades supports the existence of a common virulent ancestor of *L. monocytogenes* and *L. innocua*.

6.1.4. Taxonomie

Listeria valentina sp. nov.

En collaboration avec le Dr. Juan J. Quereda, Departamento Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, Valencia, Spain

Article publié: Quereda JJ, Leclercq A, Moura A, Vales G, Gómez-Martín Á, García-Muñoz Á, Thouvenot P, Tessaud-Rita N, Bracq-Dieye H, Lecuit M. *Listeria valentina sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020 Nov;70(11):5868-5879. (60)

Abstract: In the context of a study on the occurrence of *Listeria* species in an animal farm environment in Valencia, Spain, six *Listeria*-like isolates could not be assigned to any known species. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene and on 231 *Listeria* core genes grouped these isolates in a monophyletic clade within the genus *Listeria*, with highest similarity to *Listeria thailandensis*. Whole-genome sequence analyses based on *in silico* DNA-DNA hybridization, the average nucleotide blast and the pairwise amino acid identities against all currently known *Listeria* species confirmed that these isolates constituted a new taxon within the genus *Listeria*. Phenotypically, these isolates differed from other *Listeria* species mainly by the production of acid from inositol, the absence of acidification in presence of methyl α -D-glucoside, and the absence of α -mannosidase and nitrate reductase activities. The name

Listeria valentina sp. nov. is proposed for this novel species, and the type strain is CLIP 2019/00642^T (=CIP 111799^T=DSM 110544^T).

6.1.5. Participation à la maîtrise agroalimentaire

Critical orientation in the jungle of currently available methods and types of data for source attribution of foodborne diseases

Article publié: Mughini-Gras L, Kooh P, Fravallo P, Augustin JC, Guillier L, David J, Thébault A, Carlin F, Leclercq A, Jourdan-Da-Silva N, Pavio N, Villena I, Sanaa M, Watier L. *Critical Orientation in the Jungle of Currently Available Methods and Types of Data for Source Attribution of Foodborne Diseases*. *Front Microbiol.* 2019 Nov 12; 10:2578. (61).

Abstract: With increased interest in source attribution of foodborne pathogens, there is a need to sort and assess the applicability of currently available methods. Herewith we reviewed the most frequently applied methods for source attribution of foodborne diseases, discussing their main strengths and weaknesses to be considered when choosing the most appropriate methods based on the type, quality, and quantity of data available, the research questions to be addressed, and the (epidemiological and microbiological) characteristics of the pathogens in question. A variety of source attribution approaches have been applied in recent years. These methods can be defined as top-down, bottom-up, or combined. Top-down approaches assign the human cases back to their sources of infection based on epidemiological (e.g., outbreak data analysis, case-control/cohort studies, etc.), microbiological (i.e., microbial subtyping), or combined (e.g., the so-called 'source-assigned case-control study' design) methods. Methods based on microbial subtyping are further differentiable according to the modeling framework adopted as frequency-matching (e.g., the Dutch and Danish models) or population genetics (e.g., Asymmetric Island Models and STRUCTURE) models, relying on the modeling of either phenotyping or genotyping data of pathogen strains from human cases and putative sources. Conversely, bottom-up approaches like comparative exposure assessment start from the level of contamination (prevalence and concentration) of a given pathogen in each source, and then go upwards in the transmission chain incorporating factors related to human exposure to these sources and dose-response relationships. Other approaches are intervention studies, including 'natural experiments,' and expert elicitations. A number of methodological challenges concerning all these approaches are discussed. In absence of an universally agreed upon 'gold' standard, i.e., a single method that satisfies all situations and needs for all pathogens, combining different approaches or applying them in a comparative fashion seems to be a promising way forward.

6.2. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE 2019-2020

6.2.1. Publications nationales

Leclercq A, Le Monnier A Chapitre 68 : *Listeria monocytogenes*. Référentiel en Microbiologie Médicale (Remic) 2019, Société Française de Microbiologie.

Lecuit M, Charlier C. Listériose. Chapitre 67 Pilly, Edition, 2020.

6.2.2. Publications internationales

Charlier C, Kermorvant-Duchemin E, Perrodeau E, Moura A, Maury MM, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Valès G, Leclercq A, Ravaud P, Lecuit M; neonatal MONALISA study group. Neonatal listeriosis presentation and outcome: a prospective study of 189 cases. *Clin Infect Dis.* 2021 Apr 20:ciab337.

Quereda JJ, Leclercq A, Moura A, Vales G, Gómez-Martín Á, García-Muñoz Á, Thouvenot P, Tessaud-Rita N, Bracq-Dieye H, Lecuit M. *Listeria valentina* sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020 Nov;70(11):5868-5879.

Kurpas M, Osek J, Moura A, Leclercq A, Lecuit M, Wieczorek K. Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated From Ready-to-Eat Meat and Meat Processing Environments in Poland. *Front Microbiol.* 2020 Jun 25;11:1412. doi: 10.3389/fmicb.2020.01412.

Charlier C, Lecuit M. Maternal-fetal infections: Why do they matter? *Virulence*. 2020 Dec;11(1):398-399.

Charlier C, Disson O, Lecuit M. Maternal-neonatal listeriosis. *Virulence*. 2020 Dec;11(1):391-397.

Charlier C, Perrodeau E, Levallois C, Cachina T, Dommergues M, Salomon LJ, Azria E, Goffinet F, Ravaud P, Lecuit M. Causes of fever in pregnant women with acute undifferentiated fever: a prospective multicentric study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 May;39(5):999-1002.

Lecuit M. *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. *Cell Microbiol*. 2020 Apr;22(4):e13186.

Thomas J, Govender N, McCarthy KM, Erasmus LK, Doyle TJ, Allam M, Ismail A, Ramalwa N, Sekwadi P, Ntshoe G, Shonhiwa A, Essel V, Tau N, Smouse S, Ngomane HM, Disenyeng B, Page NA, Govender NP, Duse AG, Stewart R, Thomas T, Mahoney D, Tourdjman M, Disson O, Thouvenot P, Maury MM, Leclercq A, Lecuit M, Smith AM, Blumberg LH. Outbreak of Listeriosis in South Africa Associated with Processed Meat. *N Engl J Med*. 2020 Feb 13;382(7):632-643.

Tubiana S, Varon E, Biron C, Ploy MC, Mourvillier B, Taha MK, Revest M, Poyart C, Martin-Blondel G, Lecuit M, Cua E, Pasquet B, Preau M, Hoen B, Duval X; COMBAT study group; Principal investigator; Steering Committee; Scientific committee: steering committee and the following members; COMBAT Clinical Centers; Coordination and statistical analyses (Clinical trial unit, Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine, AP-HP, Paris); Scientific partnership; Partners. Community-acquired bacterial meningitis in adults: in-hospital prognosis, long term disability and determinants of outcome in a multicentre prospective cohort. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Jan 9. pii: S1198-743X(19)30679-2.

Charlier C, Perrodeau E, Levallois C, Cachina T, Dommergues M, Salomon LJ, Azria E, Goffinet F, Ravaud P, Lecuit M. Causes of fever in pregnant women with acute undifferentiated fever: a prospective multicentric study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Jan 18. doi: 10.1007/s10096-019-03809-3.

Rolhion N, Chassaing B, Nahori MA, de Bodt J, Moura A, Lecuit M, Dussurget O, Bérard M, Marzorati M, Fehlner-Peach H, Littman DR, Gewirtz AT, Van de Wiele T, Cossart P. A *Listeria monocytogenes* Bacteriocin Can Target the Commensal *Prevotella copri* and Modulate Intestinal Infection. *Cell Host Microbe*. 2019 Nov 13;26(5):691-701.e5.

Mughini-Gras L, Kooh P, Fravallo P, Augustin JC, Guillier L, David J, Thébault A, Carlin F, Leclercq A, Jourdan-Da-Silva N, Pavio N, Villena I, Sanaa M, Watier L. Critical Orientation in the Jungle of Currently Available Methods and Types of Data for Source Attribution of Foodborne Diseases. *Front Microbiol*. 2019 Nov 12;10:2578.

El Zowalaty ME, Hickman RA, Moura A, Lecuit M, Zishiri OT, Noyes N, Järhult JD. Genome Sequence of *Listeria innocua* Strain MEZLIS26, Isolated from a Goat in South Africa. *Microbiol Resour Announc*. 2019 Oct 31;8(44).

Pilmis B, Leclercq A, Maury MM, Moura A, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Valès G, Lecuit M, Charlier C; cutaneous listeriosis study group. Cutaneous listeriosis, a case series of 16 consecutive patients over 25 years. *J Infect*. 2020 Feb;80(2):232-254.

Sumrall ET, Shen Y, Keller AP, Rismondo J, Pavlou M, Eugster MR, Boulos S, Disson O, Thouvenot P, Kilcher S, Wollscheid B, Cabanes D, Lecuit M, Gründling A, Loessner MJ. Phage resistance at the cost of virulence: *Listeria monocytogenes* serovar 4b requires galactosylated teichoic acids for InlB-mediated invasion. *PLoS Pathog*. 2019 Oct 7;15(10):e1008032.

Shoai-Tehrani M, Pilmis B, Maury MM, Robineau O, Disson O, Jouvion G, Couplier G, Thouvenot P, Bracq-Dieye H, Valès G, Leclercq A, Lecuit M, Charlier C; *Listeria* endovascular infections study group. *Listeria monocytogenes*-associated endovascular infections: A study of 71 consecutive cases. *J Infect*. 2019 Oct;79(4):322-331.

Camargo AC, Moura A, Avillan J, Herman N, McFarland AP, Sreevatsan S, Call DR, Woodward JJ, Lecuit M, Nero LA. Whole-genome sequencing reveals *Listeria monocytogenes* diversity and allows identification of long-term persistent strains in Brazil. *Environ Microbiol*. 2019 Dec;21(12):4478-4487.

Hurley D, Luque-Sastre L, Parker CT, Huynh S, Eshwar AK, Nguyen SV, Andrews N, Moura A, Fox EM, Jordan K, Lehner A, Stephan R, Fanning S. Whole-Genome Sequencing-Based Characterization of 100 *Listeria monocytogenes* Isolates Collected from Food Processing Environments over a Four-Year Period. mSphere. 2019 Aug 7;4(4).

EFSA, ECDC, et al. (Donguy MP, Tourdjman M, Lecuit M, Leclercq A, Maury M, Moura A). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products. Stockholm and Parma: ECDC/EFSA. 2019 Jun 4; https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/20190423_Joint_ECDC-EFSA_ROA_UI-452_Lm-ST1247.pdf

Maury MM, Braccq-Dieye H, Huang L, Vales G, Lavina M, Thouvenot P, Disson O, Leclercq A, Brisse S, Lecuit M. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaptation to mammalian gut accounts for their association with dairy products. Nat Commun. 2019 Jun 6;10(1):2488.

Painset A, Björkman JT, Kiil K, Guillier L, Mariet JF, Félix B, Amar C, Rotariu O, Roussel S, Perez-Reche F, Brisse S, Moura A, Lecuit M, Forbes K, Strachan N, Grant K, Møller-Nielsen E, Dallman TJ. LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe. Microb Genom. 2019 Feb;5(2).

Moura A, Disson O, Lavina M, Thouvenot P, Huang L, Leclercq A, Fredriksson-Ahomaa M, Eshwar AK, Stephan R, Lecuit M. Atypical Hemolytic *Listeria innocua* Isolates Are Virulent, albeit Less than *Listeria monocytogenes*. Infect Immun. 2019 Mar 25;87(4). pii: e00758-18.

Leclercq A, Hardouin G, Lombard B. European and International validation of 15 main reference methods in the microbiology of the food chain. Int J Food Microbiol. 2019 Jan 2;288:1-2.

Leclercq A, Moura A, Vales G, Tessaud-Rita N, Aguilhon C, Lecuit M. *Listeria thailandensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2019 Jan;69(1):74-81.

6.2.3. Communications nationales

Cell biology of *Listeria* translocation across the intestinal epithelium, Advanced Cell Culture Systems, Institut Pasteur, Paris, France (2019) Avril 05, Marc Lecuit

Genome-based surveillance of *Listeria monocytogenes*. 39th RICAI, Interdisciplinary Meeting on Antimicrobial Therapy, Paris, France, (2019), Décembre 16-17, Marc Lecuit

Listeriosis outbreak in South Africa: What have we learned? 15^e congrès national de la Société Française de Microbiologie, Paris, (2019) Oct. 01, Alexandre Leclercq

6.2.4. Communications internationales

Characterization of atypical hemolytic *Listeria innocua*, 1st Meeting of *Listeria* Club, Instituto de Investigação e Inovação da Universidade do Porto, Porto, Portugal (2019) Janvier 25, Marc Lecuit

Twenty years of epidemiology and surveillance of listeriosis in France, new challenges in the sequencing era. 20th International Symposium on Problems of Listeriosis (ISOPOL XVI), Toronto, Canada, (2019) Septembre 24-27, Poster, M. Tourdjman, A. Leclercq, MP. Donguy, M. Maury, A. Moura, E. Laurent, S. Brisse, H. de Valk, M. Lecuit

Listeriosis. Italian Congress of Infectious Diseases, Palermo, Italie (2019) Novembre 25, C. Charlier

Study of sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cheese factory. Microbiotec, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, (2019) Décembre 5-7, Poster, Ferraz AR, Maria C, Barreira MJ, Goualo MM, Correia CB, Calhau A, Leclercq A, Lecuit M, Pintado CS.

Lessons from listeriosis outbreaks and perspectives. WHO/INFOSAN, Second global meeting of the international food safety authorities network (Infosan), Abu Dhabi, United Arab Emirates, (2019) Decembre 09, Alexandre Leclercq

Listeria and Listeriosis. WHO/INFOSAN, Second global meeting of the international food safety authorities network (Infosan), Abu Dhabi, United Arab Emirates, (2019) Decembre 09, Alexandre Leclercq

Listeriosis. Royal College of Physician Edinburg, Edinburg, UK, 2020, C. Charlier.

A GWAS of *Listeria monocytogenes* strains of food and clinical origins. European Human Genetics Conference, Berlin, Allemagne, (2020), Juin 06-09 F. Laporte, M. Maury, E Patin, A Leclercq, L Quintana-Murci, R. Chicki, M. Lecuit, H. Aschard.

6.2.5. Conférences sur invitations

Making sense of *Listeria monocytogenes* biodiversity. ASM Microbe 2019. San Francisco USA (2019) Juin 20-24, Marc Lecuit

Listeria, from fork to brain. 20th International Symposium on Problems of Listeriosis (ISOPOL XVI), Toronto, Canada, (2019) Septembre 24-27, Marc Lecuit

Clinical features of listeriosis and genomics of *Listeria monocytogenes*. International Symposium on *Listeria*, Seville, Spain, (2020), Jan 23-24

Understanding how *Listeria* crosses host barriers and disseminates within the host. CIET / Institut Pasteur Joint Symposium: Current Challenges on Infectious Diseases in Central America. University of Costa Rica. San José, Costa Rica (2019) Février 20-22, Marc Lecuit

Bridging ages with *Listeria monocytogenes*, Microorganisms bridging ages Symposium, Belgian Society of Infectiology and Clinical Microbiology, Brussels, Belgium (2019) Avril 04, Marc Lecuit

Understanding how *Listeria monocytogenes* crosses host barriers and disseminates within the host. Seminar series in Infection biology. Biozentrum. University of Basel. Basel, Switzerland, (2019) Octobre 14, Marc Lecuit

Les CNR et la stratégie européenne en matière de séquençage. M. Lecuit, Présentation orale. 9e séminaire des Centres Nationaux de référence (CNR). Santé Publique France, Saint Maurice, (2019) Novembre 15.

Listeriosis. C. Charlier-Woerther. 39e RICAI. (2019), Paris, France, Décembre 17.

Quand évoquer et comment traiter une listériose neuroméningée ? Session Recommendations 2018 sur les méningites bactériennes : où en sommes-nous ?

C. Charlier-Woerther. 41e RICAI, webconference. (2020) Décembre 17.

6.2.6. Membres de comité d'organisation ou modérateur de congrès

Caroline Charlier, Marc Lecuit membres du comité de programme de la RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), Paris, France (2019 et 2020) Décembre

Caroline Charlier, membre du conseil d'administration de la RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse)

Marc Lecuit a été membre du comité scientifique de l'International Symposium on Problems of *Listeria* and Listeriosis (ISOPOL), XXe Symposium, 24-27 Octobre 2019, Toronto, Canada.

7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX

7.1. COOPERATION

Le CNRL a participé au CES BIORISK de l'ANSES (A. Leclercq, membre du CES, jusqu'avril 2019) comprenant le groupe de travail ANSES « Attribution des Sources des dangers » pour lequel le CNRL a été auditionné avec SPF et le LNR Lm en 2017 et ayant abouti en 2019 :

- à la publication décrite au chapitre 6.1.6: *Mughini-Gras L, Kooh P, Fravalo P, Augustin JC, Guillier L, David J, Thébault A, Carlin F, Leclercq A, Jourdan-Da-Silva N, Pavio N, Villena I, Sanaa M, Watier L. Critical Orientation in the Jungle of Currently Available Methods and Types of Data for Source Attribution of Foodborne Diseases. Front Microbiol. 2019 Nov 12; 10:2578.*
- à l'article: Leclercq A, KOOH P, Augustin JC, Guillier L, Cadavez V, Gonzales-Barron U, SANAA M. Risk factors for sporadic listeriosis: a systematic review and meta-analysis. Microbial Risk Analysis. 20120 June 17.

Abstract: Listeriosis is a major public health concern associated with high hospitalization and mortality rates. The objective of this work was to summarize evidence on the associations between risk factors and sporadic cases by meta-analysing outcomes from currently published case-control studies. Suitable scientific articles were identified through systematic literature search, and subjected to a methodological quality assessment. From each study, odds-ratio (OR) measures as well as study characteristics such as population type, design, type of model and risk factor hierarchy were extracted. Mixed-effects meta-analysis models were adjusted by population type to appropriate data partitions. Twelve primary studies investigating sporadic listeriosis conducted between 1985 and 2019 passed through a quality assessment stage. These studies provided 226 OR considered for meta-analysis. According to the meta-analysis, the main risk factor for acquiring listeriosis is suffering from an immunocompromising disease. In relation to the food exposures, this meta-analysis confirmed known risk factors such as consumption of RTE dairy, seafood and processed meat and underlined new food vehicles as fruits and vegetables, recently involved in outbreaks. There were not enough data to appraise travel, animal-contact and person-to-person as transmission pathways for listeriosis. These results will allow refining the case-control studies in the aim of improving risk factors characterisation for listeriosis in the susceptible population.

A. Leclercq a été :

- membre du comité de thèse d'une doctorante de l'École Doctorale ABIÉS (Université Paris-Est), Mme Lena Fritsch, du LNRI sur « Caractérisation de la variabilité intra-spécifique des limites de croissance de *Listeria monocytogenes* à des températures basses et études des mécanismes d'adaptation au froid » sous la direction du Professeur J.C. Augustin (École Vétérinaire de Maisons-Alfort), soutenue en décembre 2019.

- sollicité pour une relecture de la fiche de danger ANSES *Listeria monocytogenes* disponible à l'adresse : <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0081Fi.pdf>.

7.2. ECHANGES ENTRE LE CNR ET LE LNR

En 2019, le CNRL a communiqué des séquences génomiques au LNRI dans le cadre de la surveillance européenne, mais n'a reçu ni souche ni séquence du LNRI en 2019-2020 notamment celles isolées dans les plans de surveillance et de contrôle des aliments de la DGAI en 2019 et 2020. Le CNRL est à la disposition du LNRI pour séquencer et typer les souches qu'il pourrait lui adresser.

8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2021-2022

Outre la poursuite des activités de surveillance et d'expertise, le programme de travail du CNRL pour les années 2021-2022 est le suivant :

Données disponibles auprès du CNR Listeria : listeria@pasteur.fr

9. REFERENCES

1. Thouvenot P, Vales G, Bracq-Dieye H, Tessaud-Rita N, Maury MM, Moura A, Lecuit M, Leclercq A. 2018. MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of *Listeria* species in surveillance: A prospective study. *J Microbiol Methods* 144:29-32.
2. Cobo F, Borrego J, Rodriguez-Granger J, Puertas A, Sampedro A, Navarro-Mari JM. 2019. Detection of bacterial pathogens in sterile fluids with the FilmArray Meningitis/Encephalitis identification system. *Rev Esp Quimioter* 32:85-86.
3. Graf EH, Farquharson MV, Cardenas AM. 2017. Comparative evaluation of the FilmArray meningitis/encephalitis molecular panel in a pediatric population. *Diagn Microbiol Infect Dis* 87:92-94.
4. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat JM, Cullison J, Daly J, Holt S, Lephart P, Salimnia H, Schreckenberger PC, DesJarlais S, Reed SL, Chapin KC, LeBlanc L, Johnson JK, Soliven NL, Carroll KC, Miller JA, Dien Bard J, Mestas J, Bankowski M, Enomoto T, Hemmert AC, Bourzac KM. 2016. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol* 54:2251-61.
5. Soucek DK, Dumkowiak LE, VanLangen KM, Jameson AP. 2019. Cost Justification of the BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel Versus Standard of Care for Diagnosing Meningitis in a Community Hospital. *J Pharm Pract* 32:36-40.
6. von Allmen N, Endelmann A, Kuehn S. 2016. Performance comparison of the new filmarray meningitis/encephalitis panel with routine diagnostic methods. *J Clin Virol* 82:S33.
7. Bastin B, Bird P, Crowley E, Benzinger MJ, Agin J, Goins D, Sohler D, Timke M, Awad M, Kostrzewa M. 2018. Confirmation and Identification of *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp. and Other Gram-Positive Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study, First Action 2017.10. *J AOAC Int* 101:1610-1622.
8. Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, Hamelin E, Laurent E, Fredriksen N, Van Cauteren D, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Tessaud-Rita N, Maury MM, Alexandru A, Crisculo A, Quevillon E, Donguy MP, Enouf V, de Valk H, Brisse S, Lecuit M. 2017. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerg Infect Dis* 23:1462-1470.
9. Moura A, Crisculo A, Pouseele H, Maury MM, Leclercq A, Tarr C, Bjorkman JT, Dallman T, Reimer A, Enouf V, Larssonneur E, Carleton H, Bracq-Dieye H, Katz LS, Jones L, Touchon M, Tourdjman M, Walker M, Stroika S, Cantinelli T, Chenal-Francisque V, Kucerova Z, Rocha EP, Nadon C, Grant K, Nielsen EM, Pot B, Gerner-Smidt P, Lecuit M, Brisse S. 2016. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat Microbiol* 2:16185.
10. Anonyme. 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA, Parma, Italie Accessible à <https://efsaonlineibrarywileycom/doi/102903/jefsa20195926>.
11. De Valk H, Tourdjman M, Leclercq A, Maury MM, Moura A, Chenal-Francisque V, Goulet V, Brisse S, Lecuit M. 2016. Changes in epidemiology and surveillance of listeriosis in France, abstr ISOPOL XIX, Paris, France, 14-17 June 2016.
12. Charlier C, Perrodeau E, Leclercq A, Cazenave B, Pilmis B, Henry B, Lopes A, Maury MM, Moura A, Goffinet F, Dieye HB, Thouvenot P, Ungeheuer MN, Tourdjman M, Goulet V, de Valk H, Lortholary O, Ravaut P, Lecuit M, group Ms. 2017. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* doi:10.1016/S1473-3099(16)30521-7.
13. Mook P, O'Brien SJ, Gillespie IA. 2011. Concurrent conditions and human listeriosis, England, 1999-2009. *Emerg Infect Dis* 17:38-43.
14. Pouillot R, Hoelzer K, Jackson KA, Henao OL, Silk BJ. 2012. Relative risk of listeriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites according to age, pregnancy, and ethnicity. *Clin Infect Dis* 54 Suppl 5:S405-10.
15. Charlier C, Fevre C, Travier L, Cazenave B, Bracq-Dieye H, Podevin J, Assomany D, Guilbert L, Bossard C, Carpentier F, Cales V, Leclercq A, Lecuit M. 2014. *Listeria monocytogenes*-associated biliary tract infections: a study of 12 consecutive cases and review. *Medicine (Baltimore)* 93:e105.
16. Charlier C, Leclercq A, Cazenave B, Desplaces N, Travier L, Cantinelli T, Lortholary O, Goulet V, Le Monnier A, Lecuit M. 2013. *Listeria monocytogenes*-associated joint and bone infections: a study of 43 consecutive cases. *Clin Infect Dis* 54:240-8.
17. Charlier C, Poirée S, Delavaud C, Khoury G, Richaud C, Leclercq A, Hélénon O, Lecuit M. 2018. Imaging of human neuroinfection: a prospective study of 71 cases. *Clin Infect Dis* In Press.
18. Chersich MF, Takkinen J, Charlier C, Leclercq A, Adams PE, Godbole G, Altmeyer U, Friesema IHM, Labbe Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter F, Luchters SMF, Lecuit M, Cimino L. 2017. Diagnosis and Treatment of *Listeria monocytogenes* Endophthalmitis: A Systematic Review. *Ocul Immunol Inflamm* doi:10.1080/09273948.2016.1276788:1-10.
19. Danion F, Maury MM, Leclercq A, Moura A, Perronne V, Leotard S, Dary M, Tanguy B, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Lecuit M, Charlier C. 2017. *Listeria monocytogenes* isolation from urine: a series of 15 cases and review. *Clin Microbiol Infect* 23:583-585.
20. Morgand M, Leclercq A, Maury MM, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Lecuit M, Charlier C. 2018. *Listeria monocytogenes*-associated respiratory infections: a study of 38 consecutive cases. *Clin Microbiol Infect* 24:1339 e1-1339 e5.
21. Pilmis B, Leclercq A, Maury MM, Moura A, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Lecuit M, Charlier C, cutaneous listeriosis study g. 2020. Cutaneous listeriosis, a case series of 16 consecutive patients over 25 years. *J Infect* 80:232-254.
22. Shoai-Tehrani M, Pilmis B, Maury MM, Robineau O, Disson O, Jouvion G, Couplier G, Thouvenot P, Bracq-Dieye H, Vales G, Leclercq A, Lecuit M, Charlier C, *Listeria* endovascular infections study g. 2019. *Listeria monocytogenes*-associated endovascular infections: A study of 71 consecutive cases. *J Infect* 79:322-331.
23. Goulet V, Hebert M, Hedberg C, Laurent E, Vaillant V, De Valk H, Desenclos JC. 2012. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin Infect Dis* 54:652-60.
24. Hof H, Nichterlein T, Kretschmar M. 1997. Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 10:345-57.
25. Leclercq A, Chenal-Francisque V, Dieye H, Cantinelli T, Drali R, Brisse S, Lecuit M. 2011. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. *Int J Food Microbiol* 147:74-7.
26. Disson O, Grayo S, Huillet E, Nikitas G, Langa-Vives F, Dussurget O, Ragon M, Le Monnier A, Babinet C, Cossart P, Lecuit M. 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* 455:1114-8.
27. Jacquet C, Doumith M, Gordon JI, Martin PM, Cossart P, Lecuit M. 2004. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis* 189:2094-100.

28. Maury MM, Tsai YH, Charlier C, Touchon M, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Criscuolo A, Gaultier C, Roussel S, Brisabois A, Disson O, Rocha EP, Brisse S, Lecuit M. 2016. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet* 48:308-13.
29. Maury MM, Bracq-Dieye H, Huang L, Vales G, Lavina M, Thouvenot P, Disson O, Leclercq A, Brisse S, Lecuit M. 2019. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat Commun* 10:2488.
30. Anonyme. 2007. Règlement (CE) no 1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) no 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes* 0012 - 0029.
31. Angelidis AS, Kalamaki MS, Georgiadou SS. 2015. Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a beta-D-glucosidase-positive phenotype on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA). *Int J Food Microbiol* 193:114-29.
32. Cotter PD, Draper LA, Lawton EM, Daly KM, Groeger DS, Casey PG, Ross RP, Hill C. 2008. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 4:e1000144.
33. Lecuit M, Nelson DM, Smith SD, Khun H, Huerre M, Vacher-Lavenu MC, Gordon JI, Cossart P. 2004. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6152-7.
34. Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, Babinet C, Cossart P. 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722-5.
35. Maury MM, Chenal-Francisque V, Bracq-Dieye H, Han L, Leclercq A, Vales G, Moura A, Gouin E, Scortti M, Disson O, Vazquez-Boland JA, Lecuit M. 2017. Spontaneous Loss of Virulence in Natural Populations of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 85.
36. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Herve-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, Courvalin P, Le Monnier A. 2010. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2728-31.
37. FAO, OMS. 2002. Exemple de la cellule "Listeria", abstr Conférence paneuropéenne sur la sécurité sanitaire et la qualité des aliments, document de séance de la délégation française, Budapest, Hongrie.
38. Roussel S., Leclercq A, Santolini A, Agbessi A, Chenal-Francisque, V. L. R. L. M., , Pihier N, Brisabois A. 2012. Surveillance des *Listeria* monocytogenes dans les aliments. . *Bull Epidemiol Bebdom Hors série*. 9 mai 2012:41-45.
39. Anonyme. 2008. Commission decision of 28 April 2008 amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council, p 46-90.
40. Anonyme. 2002. Règlement (CE) No 178/2002 du parlement européen et du conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes*:1-24.
41. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. 2013. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis* 13:11.
42. de Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, Havelaar A, Speybroeck N. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 14:1073-82.
43. Leclercq A, Charlier C, Lecuit M. Global burden of listeriosis: the tip of the iceberg. *Lancet Infect Dis* 14:1027-8.
44. Lazarus C, Leclercq A, Lecuit M, Vaillant V, Coignard B, Blanchard H, Novakova I, Astagneau P. 2013. Probable nosocomial transmission of listeriosis in neonates. *J Hosp Infect* 85:159-60.
45. Tourdjman M, Leclercq A, Groleau C, Soyer L, Moura A, Laurent E, Donguy MP, Conan G, Legoff D, Brisse S, Lecuit M, De Valk H. 2016. Hospital-Acquired listeriosis outbreak linked to prolonged contamination of a hospital kitchen environment - France, 2013, abstr International Symposium on Problems of Listeriosis (ISOPOL) XIX, Paris, France,
46. Richard S, Oggioni C, Jacquet C, Laurent E, Lequerrec F, Quelquejeu N, Goulet V. 2004. Investigations autour de cas de listériose neuroméningée: bilan de 1è mois de fonctionnement. *Bull Epidemiol Hebdom* 9:35-36.
47. Thomas J, Govender N, McCarthy KM, Erasmus LK, Doyle TJ, Allam M, Ismail A, Ramalwa N, Sekwadi P, Ntshoe G, Shonhiwa A, Essel V, Tau N, Smouse S, Ngomane HM, Disenyeng B, Page NA, Govender NP, Duse AG, Stewart R, Thomas T, Mahoney D, Tourdjman M, Disson O, Thouvenot P, Maury MM, Leclercq A, Lecuit M, Smith AM, Blumberg LH. 2020. Outbreak of Listeriosis in South Africa Associated with Processed Meat. *N Engl J Med* 382:632-643.
48. Hurley D, Luque-Sastre L, Parker CT, Huynh S, Eshwar AK, Nguyen SV, Andrews N, Moura A, Fox EM, Jordan K, Lehner A, Stephan R, Fanning S. 2019. Whole-Genome Sequencing-Based Characterization of 100 *Listeria monocytogenes* Isolates Collected from Food Processing Environments over a Four-Year Period. *mSphere* 4.
49. Painset A, Bjorkman JT, Kiil K, Guillier L, Mariet JF, Felix B, Amar C, Rotariu O, Roussel S, Perez-Reche F, Brisse S, Moura A, Lecuit M, Forbes K, Strachan N, Grant K, Moller-Nielsen E, Dallman TJ. 2019. LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe. *Microb Genom* 5.
50. Halbedel S, Wilking H, Holzer A, Kleta S, Fischer MA, Luth S, Pietzka A, Huhulescu S, Lachmann R, Krings A, Ruppitsch W, Leclercq A, Kamphausen R, Meincke M, Wagner-Wiening C, Contzen M, Kraemer IB, Al Dahouk S, Allerberger F, Stark K, Fliieger A. 2020. Large Nationwide Outbreak of Invasive Listeriosis Associated with Blood Sausage, Germany, 2018-2019. *Emerg Infect Dis* 26:1456-1464.
51. Kurpas M, Osek J, Moura A, Leclercq A, Lecuit M, Wiczorek K. 2020. Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated From Ready-to-Eat Meat and Meat Processing Environments in Poland. *Front Microbiol* 11:1412.
52. El Zowalaty ME, Hickman RA, Moura A, Lecuit M, Zishiri OT, Noyes N, Jarhult JD. 2019. Genome Sequence of *Listeria innocua* Strain MEZLIS26, Isolated from a Goat in South Africa. *Microbiol Resour Announc* 8.
53. Charlier C, Perrodeau E, Levallois C, Cachina T, Dommergues M, Salomon LJ, Azria E, Goffinet F, Ravaud P, Lecuit M. 2020. Causes of fever in pregnant women with acute undifferentiated fever: a prospective multicentric study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 39:999-1002.
54. Tubiana S, Varon E, Biron C, Ploy MC, Mourvillier B, Taha MK, Revest M, Poyart C, Martin-Blondel G, Lecuit M, Cua E, Pasquet B, Preau M, Hoen B, Duval X, group Cs, Principal i, Steering C, Scientific committee: steering c, the following m, Centers CC, Coordination, statistical a, Scientific p, Partners. 2020. Community-acquired bacterial meningitis in adults: in-hospital prognosis, long term disability and determinants of outcome in a multicentre prospective cohort. *Clin Microbiol Infect* doi:10.1016/j.cmi.2019.12.020.

55. Huttner BD, de Lastours V, Wassenberg M, Maharshak N, Mauris A, Galperine T, Zanichelli V, Kapel N, Bellanger A, Olearo F, Duval X, Armand-Lefevre L, Carmeli Y, Bonten M, Fantin B, Harbarth S, group RGWs. 2019. A 5-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect* 25:830-838.
56. Charlier C, Disson O, Lecuit M. 2020. Maternal-neonatal listeriosis. *Virulence* 11:391-397.
57. Charlier C, Kermorvant-Duchemin E, Perrodeau E, Moura A, Maury MM, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Leclercq A, Ravaud P, Lecuit M, neonatal Msg. 2021. Neonatal listeriosis presentation and outcome: a prospective study of 189 cases. *Clin Infect Dis* doi:10.1093/cid/ciab337.
58. Ferwerda B, Maury MM, Brouwer MC, Hafner L, van der Ende A, Bentley S, Lecuit M, van de Beek D. 2019. Residual Variation Intolerance Score Detects Loci Under Selection in Neuroinvasive *Listeria monocytogenes*. *Front Microbiol* 10:2702.
59. Moura A, Disson O, Lavina M, Thouvenot P, Huang L, Leclercq A, Fredriksson-Ahomaa M, Eshwar AK, Stephan R, Lecuit M. 2019. Atypical Hemolytic *Listeria innocua* Isolates Are Virulent, albeit Less than *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 87.
60. Quereda JJ, Leclercq A, Moura A, Vales G, Gomez-Martin A, Garcia-Munoz A, Thouvenot P, Tessaud-Rita N, Bracq-Dieye H, Lecuit M. 2020. *Listeria valentina* sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. *Int J Syst Evol Microbiol* 70:5868-5879.
61. Mughini-Gras L, Kooh P, Fravalo P, Augustin JC, Guillier L, David J, Thebault A, Carlin F, Leclercq A, Jourdan-Da-Silva N, PAVIO N, Villena I, Sanaa M, Watier L. 2019. Critical Orientation in the Jungle of Currently Available Methods and Types of Data for Source Attribution of Foodborne Diseases. *Front Microbiol* 10:2578.
62. Haase JK, Didelot X, Lecuit M, Korkeala H, Achtman M. 2013. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study. *Environ Microbiol* 16:405-16.
63. Haase JK, Murphy RA, Choudhury KR, Achtman M. Revival of Seeliger's historical 'Special *Listeria* Culture Collection'. *Environ Microbiol* 13:3163-71.
64. Leclercq A, Le Monnier A. 2018. *Listeria monocytogenes*, p 569-574. In *Microbiologie SFd (ed), Référentiel en microbiologie médicale (REMIC)*, 6 ed, vol 6.2, Paris, France.
65. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42:3819-22.
66. Chenal-Francois V, Charlier C, Mehvish S, Dieye H, Leclercq A, Courvalin P, Lecuit M. Highly Rifampin-Resistant *Listeria monocytogenes* Isolated from a Patient with Prosthetic Bone Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1829-30.
67. Chenal-Francois V, Maury MM, Lavina M, Touchon M, Leclercq A, Lecuit M, Brisse S. 2015. Clonogrouping, a Rapid Multiplex PCR Method for Identification of Major Clones of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 53:3355-8.
68. Bourassa L, Butler-Wu SM. 2015. Chapter 2 - MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification, p 37-85. In Sails A, Tang Y-W (ed), *Methods in Microbiology*, vol 42. Academic Press.
69. Thomas TSM, Duse A. 2019. Diagnostic challenges with *Listeria monocytogenes* identification from food and environmental samples. *International Journal of Infectious Diseases* 79:30.
70. CLSI. 2016. M45. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria.*, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
71. CLSI. 2021. M100. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 31th ed, Wayne, PA
72. Anonyme. 2020. *Comité de l'Antibiogramme de la SFM (CASFM) V1.2 Octobre 2020*, 1st ed. SFM & EUCAST, Paris, France.
73. Gholizadeh Y, Poyart C, Juvin M, Beretti JL, Croize J, Berche P, Gaillard JL. 1996. Serodiagnosis of listeriosis based upon detection of antibodies against recombinant truncated forms of listeriolysin O. *J Clin Microbiol* 34:1391-5.
74. Dack K, Pankow S, Ablah E, Zackula R, Assi M. 2019. Contribution of the BioFire((R)) FilmArray((R)) Meningitis/Encephalitis Panel: Assessing Antimicrobial Duration and Length of Stay. *Kans J Med* 12:1-3.
75. Leitner E, Hoenigl M, Wagner B, Krause R, Feierl G, Grisold AJ. 2016. Performance of the FilmArray Blood culture identification panel in positive blood culture bottles and cerebrospinal fluid for the diagnosis of sepsis and meningitis. *GMS Infect Dis* 4:Doc06.
76. Wootton SH, Aguilera E, Salazar L, Hemmert AC, Hasbun R. 2016. Enhancing pathogen identification in patients with meningitis and a negative Gram stain using the BioFire FilmArray((R)) Meningitis/Encephalitis panel. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 15:26.
77. De Lappe N, Lee C, O'Connor J, Cormican M. 2014. Misidentification of *Listeria monocytogenes* by the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol* 52:3494-5.

ANNEXE A : ORGANISATION DU CNR

A.1. MISSIONS DU CNR

Le Centre National de Référence *Listeria* s'est engagé à assurer de l'année 2017 à l'année 2021 les missions définies par le décret n° 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et l'arrêté du 16 juin 2016 fixant le cahier des charges des Centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles complété par le cahier des charges spécifiques du CNR *Listeria* de Santé Publique France pour la période 2017-2021 (mandat du 1^{er} avril 2017 au 31 mars 2022).

Il sera en outre particulièrement demandé à ce CNR les missions suivantes :

1. Expertise

- en disposant d'une expertise des méthodes diagnostiques utilisées en santé humaine comme la sérologie ou les méthodes moléculaires de diagnostic rapide, et en contribuant au développement et à la validation de nouvelles méthodes diagnostiques utilisées en santé humaine ;
- en contribuant au développement des méthodes de typage ;
- en typant en routine par une méthode discriminante fondée sur le typage moléculaire ou génomique, les souches isolées de prélèvements humains qui lui sont adressées avec une nomenclature des souches basée sur cette méthode;
- en typant en routine par une méthode discriminante fondée sur le typage moléculaire ou génomique les souches isolées de prélèvements non humains isolées lors d'investigations réalisées autour de cas de listériose humaine ;
- en étudiant la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées chez l'homme, et en surveillant l'apparition de souches de sensibilité diminuée aux antibiotiques. En contribuant à l'étude des nouveaux mécanismes de résistance en collaboration avec le CNR Résistance aux antibiotiques ;
- en collaborant avec les laboratoires travaillant en santé animale et sur les aliments (échange d'informations, de souches, etc.), et notamment le LNR et LRUE (Anses).

2. Conseil

- pas d'exigences particulières par rapport au cahier des charges général.

3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique

- par la recherche de l'exhaustivité des souches humaines en vue notamment de détecter les cas groupés ;
- en contribuant à l'investigation des cas groupés ;
- en contribuant aux systèmes de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE.

4. Contribution à l'alerte

- en signalant à l'agence nationale de santé publique la survenue de cas groupés et de tout phénomène inhabituel : augmentation du nombre de cas (si dépassement d'un seuil défini en accord avec l'agence nationale de santé publique), modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), apparition d'un nouveau phénotype de résistance, etc.

Au sein de l'Institut Pasteur, le CNRL fait partie du plan de continuité qui est une organisation minimale du CNRL permettant d'assurer la continuité de ses activités en période de crise sanitaire exceptionnelle ce qui a été activé durant les confinements et les manques de consommables/réactifs de 2020 durant la pandémie SARS-CoV2 et fonctionnel. Elle a permis au CNRL de conserver une autonomie de fonctionnement humain, matériel et de la maintenance de la collection.

A.2. PERSONNEL PERMANENT

Les effectifs

L'effectif du personnel du CNRL est présenté dans le Tableau 9.

Tableau 9. Personnel affecté au CNR des *Listeria*

Nom – Prénom	Libellé Emploi	ETP*	Organisme payeur
LECUIT Marc	Médecin, Chercheur, Responsable	0,2**	Université, APHP
LECLERCQ Alexandre	Ingénieur de recherche confirmé, Responsable-Adjoint	1	IP
MAURY Mylène***/MOURA Alexandra	Ingénieur de recherche confirmé	0,5	IP
CHARLIER-WOERTHER Caroline	Médecin, Chercheur	0,2**	Université, APHP
THOUVENOT Pierre	Technicien supérieur de laboratoire	1	IP
VALES Guillaume	Technicien supérieur de laboratoire	1	IP
BRACQ DIEYE Hélène	Technicienne supérieure de laboratoire	1	IP
DIAKITE Andrée	Assistante	0,5	IP
TOTAL Equivalent Temps Plein (ETP)		5,4	

*ETP Equivalent Temps Plein. Il s'agit du pourcentage de leur temps de travail affecté à l'activité CNR.

** Personnel non financé par SPF.

*** jusqu'en Aout 2020

Le CNRL possède collectivement une expertise médicale clinique et en microbiologie clinique, une expertise en microbiologie et sécurité sanitaire des aliments, une expertise en microbiologie fondamentale et génomique. Les responsables ont enregistré leur déclaration publique d'intérêt (<https://dpi.sante.gouv.fr>) auprès du Ministère des Solidarités et de la Santé et leur déclaration de liens d'intérêt à l'Institut Pasteur.

Les techniciens sont déclarés à l'ARS Île-de-France dans le cadre de leur activité au CNRL. L'assistante travaille à mi-temps pour le CNRL, participe à l'investigation de cas atypiques de listérioses (au suivi des correspondances avec les laboratoires pour recueillir les données clinico-biologiques) et assure l'enregistrement des métadonnées.

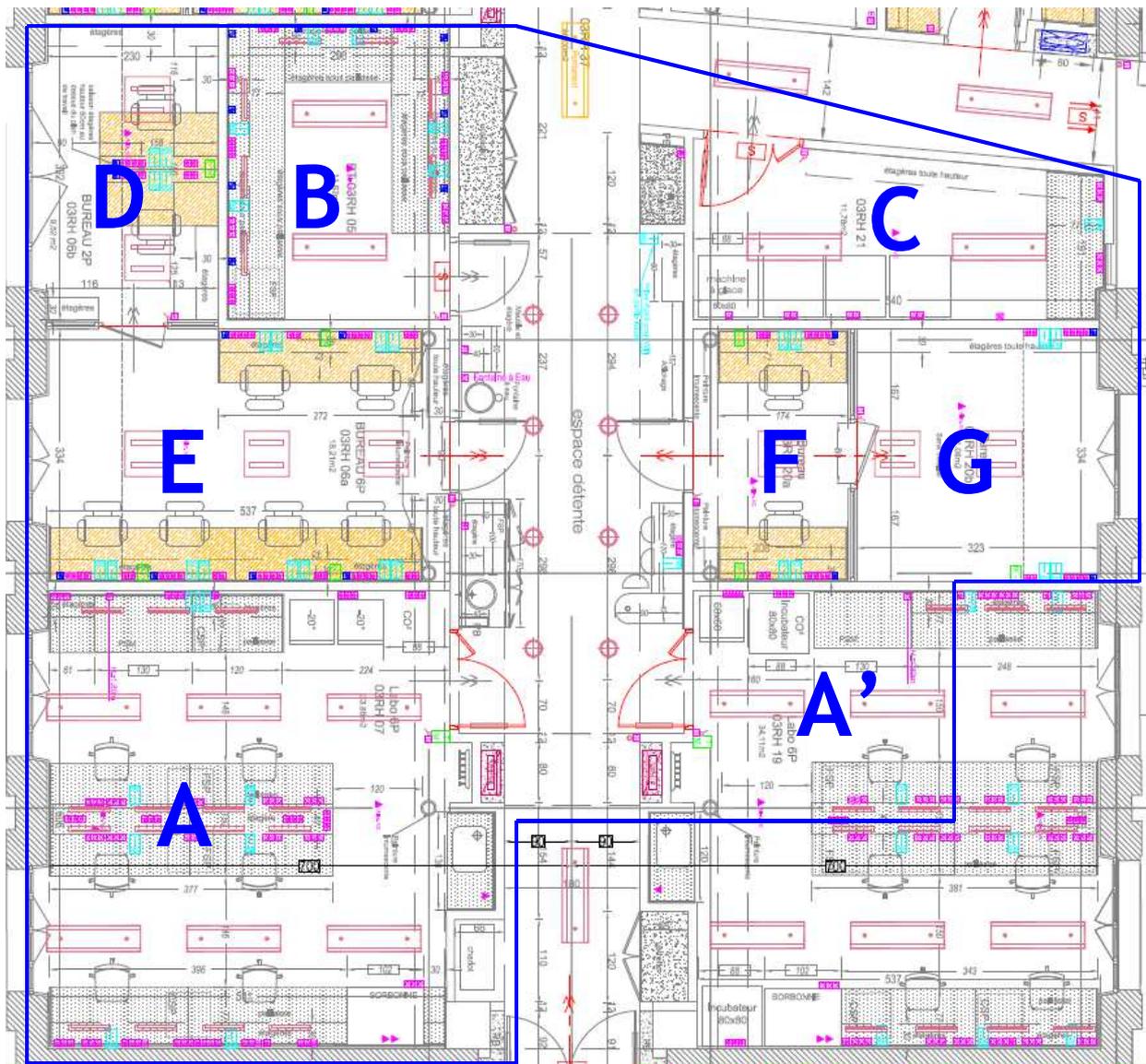
A.2. LOCAUX

Laboratoires et bureaux :

Le CNRL est hébergé depuis Octobre 2013 dans des locaux entièrement rénovés et conformes aux normes et réglementations en vigueur, au rez-de-chaussée haut du bâtiment Duclaux, aile Fourneau de l'Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris.

Les pièces décrites sur la Figure 21 hébergent le CNRL et le Centre collaborateur de l'OMS des *Listeria* (CCOMS).

Figure 21. Plan des locaux du CNR des *Listeria*. Les Lettres bleues sont définies ci-dessous



Locaux du CNRL (Figure 20) :

- 1 pièce laboratoire dédiée (A) et accès à un laboratoire de recherche et de réception des colis (A')
- 1 pièce de PCR partagée (B)
- 1 pièce d'incubation partagée (C)
- 1 pièce de pesée partagée
- 1 chambre froide partagée
- 3 pièces de bureaux dédiées (D, E, F)
- 1 bibliothèque /salle de réunion /Archives partagées (G)
- 1 laverie / salle des autoclaves / salle de préparation partagées avec d'autres CNR et Unités.

L'ensemble de ces pièces suit le processus de la marche en avant du propre vers le sale. Les pièces critiques (collection, etc.) sont sous surveillance de température et ont été incorporées au plan de continuité d'activité de l'Institut Pasteur.

A.3. EQUIPEMENT

L'ensemble des équipements scientifiques critiques pour les essais fait l'objet d'un suivi métrologique (Etalonnage-Cartographie et/ou vérification et d'un suivi continu des températures) ou d'une maintenance.

L'Institut Pasteur a financé l'acquisition d'équipements en 2019 pour la PCR (Un flux laminaire pour la préparation des mélanges réactionnels PCR) et de stockage (1 congélateur -20°C pour stocker les ADNs extraits du CNR) et en 2020 pour l'électrophorèse des produits de PCR (renouvellements générateurs et cuves) dans le cadre du cahier des charges SPF du CNR, de l'accréditation du CNRL et du respect des réglementations.

Matériel, équipements utilisés

- Matériel courant d'un laboratoire règlementaire de confinement L2 de microbiologie classique et de biologie moléculaire,
- 2 postes de sécurité microbiologique PSM II,
- 1 hotte à flux laminaire pour la préparation des mélanges réactionnels PCR,
- 2 étuves,
- 3 bains thermostatés humides et 1 bain thermostaté à sec,
- 5 réfrigérateurs,
- 3 congélateurs,
- 2 congélateurs -80°C,
- 3 centrifugeuses dont une pour les plaques,
- 3 thermocycleurs en point final (Pouvant être partagés dans le cadre du mode dégradé du LREMS),
- 2 générateurs et cuves d'électrophorèse,
- 2 néphélomètres
- 1 fax et 1 copieur conformes à la réglementation sur les données de santé.

Equipements partagés

- 1 balance de pesée de précision,
- 1 inoculateur multipoint partagé,
- 1 système de prises de vues photographiques couplé à un ordinateur,
- 1 machine à glace,
- 1 photocopieuse-scanner conforme à la réglementation sur les données de santé,
- 1 lecteur automatique Scan 4000 (InterSciences) d'antibiogrammes intégrant les référentiels CA-SFM, EUCAST et CLSI,
- 1 thermocycleur temps réel partagé avec d'autres CNRs.

Equipement informatique

L'ensemble des équipements informatiques (7 ordinateurs, 2 imprimantes) est en location et géré par une société privée en contrat avec l'Institut Pasteur. Cette société est soumise à un contrat de confidentialité et de respect des exigences CNIL pour les données de santé publique et celles des correspondants du laboratoire. Le parc informatique est renouvelé tous les 3-4 ans.

Moyens extérieurs à la structure / Structures transversales

- Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence : accès à un appareil de PCR en temps réel,
- Plateforme PIBnet/P2M séquençage (Illumina) et spectrométrie de masse Maldi-Tof Microflex BIOTYPER(Bruker Daltonics),
- Animaleries de l'Institut Pasteur.

A.4. MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE

Les différentes collections de souches bactériennes

Il existe 8 catégories de souches envoyées au CNRL :

1. **souches humaines** : souches ayant été à l'origine de cas cliniques.
2. **alerte sanitaire** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de production de ces aliments, isolées dans le cadre d'investigation de cas groupés ou d'épidémies et lors d'enquêtes ponctuelles autour d'un cas, à la demande de l'InVS, de la DGS, de la DGAL ou de la DGCCRF.
3. **alerte produit** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de production de ces aliments, isolées dans le cadre de contrôles officiels ou autocontrôles faisant l'objet d'une alerte DGAL avec saisie, retrait, ou rappel de produit. Ces « alertes-produits » correspondent soit à des « non-conformités » aux critères réglementaires fixés pour les aliments (présence de *Lm* ou dépassement du seuil de 100 *Lm*/g-ml), soit à des situations considérées par la DGAL comme des menaces pour la santé publique.
4. **plans de surveillance/contrôle et contrôles officiels** placés sous la responsabilité de la DGAL et de la DGCCRF/DGDDI. Pour cette catégorie, dès lors que l'on se trouve en situation d'alerte telle que décrite au point 3 ci-dessus, la souche passe de la catégorie 4 à la catégorie 3.
5. **autocontrôles** : Les souches provenant de « clients » particuliers (industriels dans le cadre d'autocontrôles, laboratoires vétérinaires départementaux (LVD), laboratoires privés d'hygiène et de contrôle, etc.).
6. **santé animale** : souches transmises par les LVD dans le cadre de la surveillance de la santé animale.
7. **études et projets de recherche** : souches isolées lors d'enquêtes, d'études sur un type de produit ou une filière particulière, ou dans le cadre de projets de recherches.
8. **environnement** : souches environnementales (eau, aliments pour animaux, sol, boues de station d'épuration, etc.)

Leur mise en collection permet de disposer d'une large banque de souches (associées à une banque de données scientifiques et clinico-biologiques), utile dans le cas d'investigations de clones épidémiques.

Le CNRL maintient et met à disposition sur demande motivée les souches types des espèces de *Listeria* et les souches de référence pour la sérotypie, ainsi que les sérums de sérotypie non commercialisés.

En 2019 et 2020, le CNRL n'a pas reçu de demandes de distribution de sérums et n'a pas communiqué de souches d'alertes produits au LNRI. Le CNRL échange maintenant les séquences génomiques qu'ils possèdent comme lors des investigations d'épidémies comme décrit précédemment.

Par contre, il a distribué des souches :

- à l'Institute of Food, Nutritional and Health, ETH Zurich (Zurich, Suisse) dans le cadre d'une étude sur *Listeria monocytogenes* sérotype 4ab ;
- au Phage Technology Center (PTC, Bönen, Germany) dans le cadre de la propagation d'un phage ;
- à l'IP Proyecto Autonomico Emergente, Universidad CEU Cardenal Herrera (Valence, Espagne) dans le cadre d'une recherche ;

- à la Faculté Vétérinaire Vétérinaire, Université Ilorin (Ilorin, Nigéria) dans le cadre d'une aide à une étude sur la prévalence des *Listeria* dans les aliments
- à l'Université KU LEUVEN, Faculté des BioSciences (Leuven, Belgique) dans le cadre d'une étude sur l'îlot LIPI-3
- à l'Université de Poitiers, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, CHU Poitiers dans le cadre d'une étude de génomique.

Souches types des espèces de *Listeria* et souches de référence pour la sérotypie

Le CNRL dispose des souches types complètement caractérisées des 21 espèces et 6 sous-espèces du genre *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* subsp. *grayi*, *L. grayi* subsp. *murrayi*, *L. rocourtiae*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii*, *L. fleischmannii* subsp. *colorendiensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, *L. newyorkensis*, *L. costaricensis*, *L. goensis*, *L. thailandensis*, *L. valentina*), ainsi que des 15 souches de référence pour la sérotypie. Le CNR actualise sa collection avec les nouvelles espèces ou souches atypiques. Toutes ces souches sont conservées en géloses profondes dans des pièces à température contrôlée, et à -80°C en tubes de cryo-billes dans deux congélateurs sous alarme.

Collection de *Listeria* de l'Institut Pasteur (CLIP)

Chaque année, la collection du CNRL et du CCOMS s'incrémente d'environ 2000 nouvelles souches caractérisées par phénotypie, génosérotypage, PFGE et/ou génome. Une base de données Lagon regroupe l'ensemble des métadonnées sur ces souches (ainsi que des données cliniques minimales pour les isolats humains). Une base de données BioNumerics et BIGSdb-*Listeria* permettent de stocker les données de PFGE et de génomique, respectivement, associées aux souches caractérisées par ces méthodes.

Cette collection, majoritairement française, mais également internationale (CCOMS) comportait 116.616 souches à la fin de l'année 2020. Ces souches sont d'origine clinique, alimentaire et environnementale, ainsi que vétérinaire ou de recherche. **Il s'agit d'une collection unique, de par son caractère prospectif et exhaustif**, qui centralise les souches humaines et alimentaires du système de surveillance français. Environ 72.315 souches de cette collection proviennent du CNRL. Elles sont conservées en géloses profondes dans une pièce à température contrôlée. Les souches d'origine humaine et, depuis janvier 2017, les souches alimentaires et de l'environnement sont conservées à -80°C en tubes de cryobilles dans deux congélateurs sous alarme. Le CNRL conserve également des souches isolées entre 1987 et 1992 provenant de la collection du CNRL alors hébergé au CHU de Nantes.

Special *Listeria* Culture Collection (SLCC)

Il s'agit de la collection de *Listeria* d'H.P.R. Seeliger (Würzburg, Allemagne) qui comporte plus de 5000 souches isolées entre 1926 et 1985. L'intérêt de cette collection léguée au CCOMS *Listeria* est de contenir des souches anciennes, isolées depuis la première souche de *L. monocytogenes* (1921), de diverses origines géographiques, mais majoritairement France et Allemagne. Une base de données regroupe l'ensemble des données sur ces souches. Certaines sont actuellement utilisées dans le cadre de projets de recherche sur l'évolution et la biodiversité de *Listeria* (62, 63). Ces souches ont été caractérisées phénotypiquement et sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée.

Collection ILSI North America

Il s'agit de la collection du Technical Committee on Food Microbiology of ILSI North America contenant 43 isolats complètement caractérisés : 25 souches représentant la diversité des *Lm* et 18 souches d'épidémies, mises à disposition du CCOMS. Elles sont utilisables pour évaluer et valider des méthodes d'analyse ou de typage moléculaire et réaliser des essais de microbiologie prévisionnelle ou de croissance/survie. Elles sont conservées à -80°C en tube de cryobilles dans un congélateur sous alarme.

Collection du Centre de Ressource Biologique de l'Institut Pasteur (CRBIP) comprenant la Collection de l'Institut Pasteur

Il s'agit d'une collection sous management de la qualité (certifiée AFAQ NF 96 900) où le CNRL a déposé depuis 2004 sous contrat 152 souches qui constituent un échantillon représentatif des souches françaises humaines et non humaines du genre *Listeria* isolées de 1981 à nos jours (souches d'épidémies, de travaux de séquençage, de sérovars rares, de référence, types, etc.) ainsi que les souches de référence de taxonomie et de sérotypie. Des souches du genre *Listeria* et de l'espèce *monocytogenes* ayant des propriétés originales sont régulièrement mises en collection. La liste de ces souches est consultable à l'adresse web : https://catalogue-crbip.pasteur.fr/recherche_catalogue.xhtml et elles sont disponibles moyennant une somme couvrant les frais d'envoi et de maintien en collection sous assurance qualité. Le CNRL effectue des confirmations des caractéristiques des souches conservées à la demande du CRBIP.

Les bactériophages

Le CNRL possède la collection de bactériophages (et des souches *Listeria* de propagation) de lysotypie du Centre International de Lysotypie des *Listeria* (1982-1992 ; Institut Pasteur, Paris). Cette collection présente un intérêt du fait des nouveaux outils diagnostics fondés sur l'utilisation des phages, leur utilisation potentielle en thérapeutique et en sécurité microbiologique des denrées alimentaires telle que le phage P100 ayant obtenu l'autorisation GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA aux USA et l'utilisation d'emploi en Europe en 2019.

Conditions de mise à disposition des collections

Le CNRL valorise son savoir-faire et son expertise sur *Listeria* en mettant à disposition de tiers académiques et industriels des duplicatas des souches initialement reçues (à noter que la collection CNRL est donc préservée).

L'accès au matériel biologique collecté dans le cadre de l'activité du CNRL est conditionné :

- à ce que l'utilisation envisagée du matériel biologique réponde à un objectif de santé publique ;
- à la mise en place de documents contractuels spécifiques.

Ainsi, est exigé pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place à minima d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, contrepartie financière qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire.

Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNRL soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique.

À tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNRL.

Dossiers règlementaires

Le CNRL ne possède pas de collections d'échantillons humains et n'utilise pas d'organismes génétiquement modifiés, alors que l'Unité de Biologie des Infections également dirigée par Marc Lecuit et au sein de laquelle il est hébergé détient ces autorisations.

A.5. MAINTIEN ET DETENTION DES BASES DE DONNEES DU CNRL

Gestion, protection et sauvegarde de la base de données du CNRL

Les données épidémioclinico-microbiologiques collectées pour chaque souche sont rassemblées dans le Système Informatique du Laboratoire (SIL) du CNRL. Il est en conformité avec les exigences réglementaires et normatives actuelles (norme NF EN ISO 15189 d'accréditation des laboratoires d'analyses de biologie médicale et de l'ASIP Santé (Agence des Systèmes d'Information Partagés de Santé)). Le CNRL a une déclaration à jour de cette base de données auprès de la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL) : Déclaration Normale, Numéro de déclaration 1474696v0, Récépissé reçu de la CNIL en date du 19 janvier 2011.

Gestion des données clinico-biologiques : Logiciel LAGON® (EpiConcept)

Le logiciel LAGON® (EpiConcept) est utilisé depuis le 1er janvier 2005, et permet la gestion en temps réel des échantillons (suivi administratif, enregistrements des résultats techniques, etc.), l'anonymisation des données, leur archivage et une meilleure traçabilité. Ce logiciel est en cours de remplacement par un nouveau logiciel qui devait être réalisé par la société AGILAB pour le LREMS dont fait partie le CNRL afin d'intégrer le suivi en temps réel de l'échantillon par le laboratoire correspondant, une meilleure interaction avec les partenaires (SPF, DGAI, etc.) du CNRL et la récupération de ses résultats sous une forme dématérialisée via une interface sécurisée web. Ce développement a permis de redéfinir les processus dans le CNR et les optimiser.

Base de spectres de masses de souches de *Listeria* : le CNRL a constitué depuis 2016 une base de données de plus de 11298 spectres de masse de *Listeria* obtenus par spectrométrie de masse Maldi-Tof sur équipement Bruker Daltonics. Cette base de données est gérée sous les logiciels MBT Compass Explorer (Bruker) et bionumerics version 7.6. par les techniciens du CNRL.

BIGSdb-*Listeria* (<https://bigfdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>) : Le CNRL, en collaboration avec Sylvain Brisse (Unité de Biodiversité et Épidémiologie des Bactéries Pathogènes, Institut Pasteur), a créé en 2014 la base de données de cgMLST qui héberge aussi la base de données MLST (précédemment PubMLST-*Listeria*, créée en 2012). BIGSdb-*Listeria* est hébergée par l'infrastructure informatique de l'Institut Pasteur et utilise le code source développée par Keith Jolly (Université d'Oxford). Cette base contient l'ensemble des utiles informatiques, séquences d'allèles et profils alléliques de MLST, cgMLST, genosérogrouping, virulence, résistance, entre autres, ouverte et accessible en ligne à la communauté scientifique. Des projets privés peuvent être établis par des demandeurs. À la fin de l'année 2020, la base contenait plus de 61500 génomes publics ou privés de *Listeria*. En 2019-2020, le CNRL (A. Moura) a curé 35000 génomes de *L. monocytogenes* de 63 pays. Ce système partagé favorise les échanges et les collaborations internationales sur l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria*.

Base de données et outil de comparaison PFGE/cgMST : Logiciel Bionumerics 7.6® (Applied Maths) : Le CNRL possède une base de données des profils de macrorestriction des souches réceptionnées au CNRL depuis 2005 qui comporte outre les 17718 profils de macrorestriction et 16540 profils cgMLST, le numéro de la souche, son origine humaine-alimentaire-autre définie par une lettre, le numéro d'alerte produit associé, son pays de provenance, sa sensibilité aux antibiotiques, la date de prélèvement pour les souches humaines, le type de produits ou d'environnement pour les souches non humaines, des remarques techniques, les numéros de ces profils et les données de MLST et cgMLST. En 2019-2020, le CNRL a continué de travailler sur la version 7.6.

Les conditions de mise à disposition

L'accès aux données des bases relève des mêmes conditions que celles indiquées dans le chapitre précédent pour les souches de collections.

A.6. MANAGEMENT DE LA QUALITE ET HYGIENE/SECURITE AU SEIN DU CNRL

Le CNRL était accrédité depuis 2015 par le COFRAC selon la norme EN ISO 15189 v2012 (Attestation d'accréditation LREMS N°8-2588, Examens Médicaux, disponible sur le site web du COFRAC www.cofrac.fr) et fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 14. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation. Le système de management de la qualité du CNRL repose sur plus de 490 documents dématérialisés et rassemblés dans la base de gestion documentaire de l'Institut Pasteur (Webcampus). Le géosérotypage avait été sélectionné en 2014 pour l'accréditation, car c'est un outil qui permet d'assurer une traçabilité entre les ADN envoyés à la plateforme de séquençage PIBnet/P2M et la séquence. Ces documents sont revus au minimum tous les deux ans et appliqués par l'ensemble du CNRL. Ce système est conforme aux normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 17025. Le correspondant qualité est A. Leclercq.

Le projet d'accréditation ISO 15189 de l'Institut Pasteur est une démarche dynamique pilotée par :

- la Direction aux Ressources Techniques et à l'Environnement et son Service Qualité, qui apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015) ;
- la Direction de la Recherche Médicale ;
- et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités. Ils se font régulièrement auditer dans le cadre de leurs activités en interne et par les organismes de certification et d'accréditation.

Malgré le contexte sanitaire, Le LREMS a maintenu son système de management de la qualité et a renouvelé son accréditation lors de l'audit en octobre 2020 avec la confiance accordée des évaluateurs COFRAC.

Les CNR ont été prioritaires dans le Plan de Continuité de l'Activité de l'Institut Pasteur avec un soutien et une mobilisation de l'ensemble des services supports de l'Institut pour permettre au mieux la continuité de leurs missions.

L'ensemble des CNR participent annuellement à des contrôles externes de la qualité. Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux.

Liste des faits marquants survenus en 2019-2020 :

1. Evaluation de surveillance S6 et/ou d'extension COFRAC LRE-MS du 15 au 18 avril 2019 dont le CNR *Listeria* (évalué une journée en technique et management de la qualité) : Le rapport d'évaluation indique que les évaluateurs accordent leur confiance au LRE-MS dont le CNR *Listeria*
2. Revue qualité LRE-MS du CNR *Listeria* : 10 Avril 2019
3. Revue de direction du LRE-MS : 03 Juin 2019
4. Audits internes technique et qualité : 28 Novembre 2019 (Qualité) – 23 décembre 2019 (Technique)
5. Revue qualité LRE-MS du CNR *Listeria* : Septembre 2020
6. Revue de direction du LRE-MS : Septembre 2020
7. Audit de renouvellement et d'extension COFRAC LRE-MS en 6-8 Octobre 2020
8. Audit interne qualité et technique : Novembre 2020
9. Arrêt de l'accréditation 27/10/20, maintien d'une démarche qualité

Le CNRL ne fait pas des actes de biologie médicale. Dans ces conditions et suite au retour de la consultation du Comité des CNR de SPF par l'Institut Pasteur et le Comité des Biologistes de la DGS sur l'accréditation des CNR selon la NF EN ISO 15189, le CNRL ne poursuit pas son accréditation NF EN ISO 15189 puisqu'aucune obligation légale ou contractuelle ne l'y oblige, mais il va maintenir uniquement un management de la qualité sous les 6M (maintien du système qualité sans les évaluations tierces-parties dont COFRAC).

En 2018, le CNRL a envoyé une enquête de satisfaction clients débouchant sur les principaux axes d'amélioration suggérés qui sont des résultats disponibles par voie dématérialisée via internet. En 2019 et début 2020, le CNRL a investigué pour répondre à la demande de ses laboratoires correspondants la mise en place d'un envoi hautement sécurisé par mails chiffrés avec accusé de réception et preuve de dépôt au moyen de la plateforme Bluefiles (<https://mybluefiles.com/fr/>), déjà utilisée par la DGS et SPF, dont le déploiement au CNRL a été réalisé durant le premier confinement de 2020.

Dans le cadre de son accréditation, le CNRL a mis en place un système permettant d'effectuer des analyses en urgence et en mode dégradé avec accord des autorités compétentes.

Le calendrier des demandes d'accréditation de méthodes est présenté dans le tableau 8.

Tableau 8. Liste des méthodes soumises à l'accréditation et volume d'activité annuelle (%)

Méthodes analytiques	% Activité	Année d'accréditation
Génosérotypage de <i>Listeria monocytogenes</i>	100%	2015

Essais d'intercomparaison (EQA)

En 2019 et 2020, le CNRL a réalisé un essai d'intercomparaison organisé par l'ECDC sur le génosérotypage de *Lm* par PCR multiplexe point final ou par PCR *in silico* déduite de la séquence génomique de la souche (Tableau 9). Le but est de vérifier que les CNRs génèrent des résultats similaires à partir d'un même échantillon, condition essentielle pour que des échanges de données puissent avoir lieu.

Tableau 9. Résultats du CNRL à l'EQA de l'EURL puis de l'ECDC de 2012 à 2020

Campagne EQA (Date)		EURL <i>Lm</i> (Avril 2012)	EOA N°1 ECDC (Mars 2013)	EOA N°2 ECDC (Octobre 2013)	EOA N°3 ECDC (Octobre 2014)	EOA N°4 ECDC (Octobre 2015)	EOA N°1 ISP (décembre 2016)	EOA N°1 Bruker (septembre 2017)	EOA N°5 ECDC (Octobre 2017)	EOA N°6 ECDC (Octobre 2018)	EOA N°7 ECDC (Juillet 2019)	EOA N°8 ECDC (Juillet 2020)
Nombre de laboratoires participants		33	18	18	18	18	2	5	18	18	18	18
Nombre de souches testées		10	10	10	11	11	15	36	11	11	11	11
Identification <i>Lm</i> par phénotypie		Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND	ND
Identification <i>Lm</i> par Maldi-Tof MS		ND	ND	ND	ND	ND	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND
Scores sérotypage classique		ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Scores sérotypage moléculaire - PCR multiplexe		ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Scores sérotypage moléculaire – PCR <i>in silico</i>		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Conforme	Conforme	Conforme
Qualité Gel PFGE	Ascl	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND	ND
	Apal	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND	ND
Analyse gel PFGE Bionumerics		Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Hygiène/Sécurité

Le correspondant hygiène et sécurité du CNRL est P. Thouvenot.

A.7. REGLEMENT GENERAL SUR LA PROTECTION DES DONNEES (RGPD)

Dans le cadre de la mise en œuvre du nouveau Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD) entré en application le 25 mai 2018, l'Institut Pasteur a institué un programme permanent de conformité au RGPD.

Il a dans cadre de celui-ci :

- désigné un délégué à la protection des données (DPO) depuis juillet 2018 ;
- établi un registre des opérations de traitement pour lesquelles il agit d'une part en qualité de responsable du traitement et d'autre part en qualité de sous-traitant ;
- souscrit auprès de la CNIL un engagement de conformité aux méthodologies de référence MR-01 – MR-02 et MR-03 ;
- pris des initiatives de sensibilisation de ses personnels à la protection des données.

Le LREMS, dont le CNRL, s'est mis en conformité par rapport à la réglementation RGPD (Site web, fiches de renseignements, comptes rendus d'analyses, gestion des données). Le CNRL fait partie du comité pilote sur la RGPD.

Le correspondant communication est également correspondant RGPD (Règlement général sur la protection des données) du CNRL est A. Diakite.

ANNEXE B : ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR *LISTERIA*

B.1. METHODES DE REFERENCES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES

Le CNRL reçoit les souches de *Lm* isolées de patients par les biologistes médicaux [laboratoires publics hospitaliers et Laboratoires d'Analyses de Biologie Médicale (LABM) privés, ainsi que LABM plateformes de Microbiologie privés]. Il reçoit également des souches isolées d'aliments ou de l'environnement de production alimentaire qui sont envoyées au CNRL par les laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments publics agréés (LVD, LDA, SCL, Laboratoires privés, etc.). Ces souches d'origine alimentaire ou environnementale sont envoyées dans le cadre d'alertes appelées « alertes-produits » générées par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI), la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) ou dans le cadre d'investigations autour de cas ou d'autocontrôles.

Les souches font systématiquement l'objet des analyses suivantes :

- **Vérification de la pureté** des souches réceptionnées sur gélose nutritive (Sous-processus de la méthode de l'étape Identification). Si la souche envoyée est un mélange de souches, elle est isolée sur gélose sélective chromogène ALOA® (AES Laboratoire, France) et sur gélose au sang de cheval (bioMérieux, France).

- **Identification du genre et de l'espèce** par spectrométrie de masse MALDI-ToF (Bruker Daltonics, Allemagne) et recherche du caractère hémolytique, complétés par d'autres tests classiques si nécessaire (1, 64). Les tests biochimiques [galerie API-*Listeria*® (bioMérieux, France)] ne sont utilisés qu'exceptionnellement, en cas de panne du spectromètre de masse ou de résultats ambigus ou de détermination de la sous-espèce, ainsi que pour comparaison avec les résultats de laboratoires correspondants. L'identification des souches atypiques est confirmée par analyse du gène codant pour la sous-unité ribosomale 16S après amplification par PCR pour les souches non *Listeria* spp. ou par séquençage du génome en cas de *Listeria* spp.

- **Détermination du sérotype PCR** (Méthode accréditée ISO 15189 jusque fin Octobre 2020) selon la méthode publiée par le CNRL en 2004 (65) et amendée en 2011 (25). Cette PCR multiplex cible une partie de la séquence du gène *prs* présent dans l'ensemble des espèces décrites de *Listeria* et quatre autres gènes (*Lmo1118*, *Lmo0737*, *ORF2110*, *ORF2819*) spécifiques de *Lm*, permettant de déterminer le sérotype PCR. Cette PCR multiplex peut être effectuée directement sur colonie sur gélose de la souche envoyée par le correspondant. Le sérotype PCR est également identifié *in silico* à partir de la séquence génomique. La comparaison du sérotype PCR déterminé *in silico* avec celui déterminé *in vitro* est utilisée comme contrôle interne pour confirmer la concordance entre la séquence génomique et l'isolat correspondant. Le CNRL possède l'ensemble des sérums antifacteurs O et H commerciaux et de référence OMS pour réaliser sur demande (majoritairement hors-France) le sérotype classique des souches de *Listeria* spp.

- **Antibiogramme** de toutes les souches d'origine humaine en utilisant la technique de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations de l'EUCAST. Ces antibiogrammes sont effectués sur un panel de 23 antibiotiques. La lecture de l'antibiogramme est réalisée sur un automate Scan 4000 (InterScience) paramétré pour le référentiel EUCAST. Les éventuelles résistances sont confirmées par la détermination de la CMI par E-test. Les mécanismes des résistances identifiées sont ensuite étudiés (36, 66).

- **Séquençage du génome**. Les ADNs génomiques sont extraits (méthode DNeasy Blood & Tissue extraction kit (Qiagen, Danemark)) et vérifiés en qualité par fluorimétrie. La préparation des bibliothèques est réalisée en utilisant le kit NEXTERA XT DNA Sample et les séquences génomiques sont déterminées sur la plateforme Illumina NextSeq 500 (Illumina, Californie, USA). L'assemblage est réalisé avec le logiciel SPAdes. Le profil cgMLST est extrait du génome assemblé par l'algorithme BLASTN implémenté sur la plateforme BIGSdb-*Lm* (<http://bigsdbs.pasteur.fr/Listeria/Listeria.html>) puis transféré dans le logiciel bioNumerics version 7.6. pour réaliser les comparaisons et analyses. Cette méthode cgMLST est utilisée depuis le 1^{er} janvier 2017 en routine pour la surveillance, en remplacement de la PFGE. L'analyse des génomes permet également la caractérisation de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques et antiseptiques.

D'autre part, en cas de nécessité, les analyses suivantes peuvent être effectuées :

- **Typage rapide de souches.** Sur la base du schéma MLVA que le CNRL a établi, les souches d'intérêt de *Lm* peuvent être typées et leur appartenance à un type MLVA déterminée rapidement. Il s'agit d'un outil de criblage rapide qui peut être utile en cas d'épidémies.

- **Typage MLST par PCR multiplexe.** L'appartenance à un clone MLST peut être déterminée rapidement par une méthode de PCR multiplexe (PCR de clonogrouping) développée et brevetée par le CNRL (67). Cette méthode permet de positionner rapidement les souches par rapport aux clones MLST majeurs et d'ainsi prédire le potentiel infectieux des souches (28).

- **Caractérisation de la virulence des souches de *Lm*** par inoculation par voie orale ou parentérale de gerbilles ou de souris humanisées et/ou par des tests *in vitro*.

- À la demande de l'ANSM, le CNRL réalise également des **analyses de détection de souches de *Lm* viables** par isolement sur gélose ALOA (bioMérieux) à partir d'échantillons de selles. En 2019, aucune de *L. monocytogenes* viables n'a été isolée dans une selle expertisée par le CNRL dans le cadre de l'investigation d'un cas à Marseille. Le CNRL a mis en place avec les biologistes de Marseille la procédure pour l'examen de selles dans le cadre de la transplantation fécale.

Le CNRL ne réalise pas :

- de sérologie, compte tenu de l'intérêt en pratique clinique non démontré de cette technique,

- de PCR ou qPCR sur LCR ou d'autres échantillons cliniques à visée diagnostic, qui sont effectuées en LABM de 1^{er} intention. La qPCR *hly*, très spécifique peut constituer une aide diagnostique, notamment dans les formes neuroméningées. Les PCR syndromiques méningites peuvent présenter une sensibilité diminuée par rapport à la qPCR spécifique.

B.2. TECHNIQUES RECOMMANDÉES PAR LE CNRL

En microbiologie clinique

Le CNRL recommande de suivre les recommandations de l'European Manual of Clinical Microbiology / REMIC européen, 6e édition, 2018, chapitre *Listeria* (64).

Dans le cas de la réception d'un prélèvement en vue de la réalisation d'une PCR sur échantillons biologiques ou de sérologie, le CNRL transfère la demande au service accrédité COFRAC de Microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants malades pour les demandes de PCR sur LCR et aux laboratoires spécialisés (Cerballiance ou Biomnis) pour les demandes de sérologie (Les tests sérologiques ne sont pas recommandés par le référentiel en Microbiologie (REMIC) 2018 (64)).

- *Culture - Isolement - Incubation (24 h -37°C)*

Hémoculture : milieux commerciaux classiques

LCR : Bouillon nutritif glucosé à 0,5%

Selles : isolement directement sur gélose ALOA™ ou géloses équivalentes si selles de moins de 24h sinon isolement après congélation -20°C durant 2 semaines si selles de plus de 24h. Cerballiance a été formé à cette technique et peut la réaliser.

Une détection est possible par une qPCR *Hly* sur une extraction d'ADN avec un kit spécialisé pour l'extraction d'ADN dans les faeces ou le sol. Un témoin de selles contaminés par de l'ADN de *Lm* devrait être mis en parallèle pour détecter une possible inhibition.

Autres prélèvements : Gélose nutritive ordinaire ou à 5% de sang frais, supplémentée ou non en acide nalidixique et colistine (Gélose ANC). À noter que des souches de *L. monocytogenes* deviennent sensibles à l'acide nalidixique.

- *Identification*

L'identification par MALDI-TOF est correcte pour les principales espèces isolées en France pour le système MALDI-TOF MS Bruker Daltonics équipé ou non du système subtyping développé spécifiquement pour *Listeria* et est correcte pour le genre pour le MALDI-TOF MS Vitek MS (bioMérieux) (1, 68). La simple préparation directe est suffisante, mais en cas de résultats douteux une extraction totale des protéines est conseillée.

Le CNRL recommande les galeries API *LISTERIA* (bioMérieux) qui ont un dossier complet de validation, à défaut API *CORYNE* (bioMérieux) ou la galerie MICROBACT 12L (Oxoid) ainsi que le Vitek 2 (bioMérieux) (69). Les galeries API *CORYNE* doivent être complétées par des tests supplémentaires, car elles ne permettent que le diagnostic de genre *Listeria* et sont à l'origine de confusions notamment l'absence de distinction entre *L. grayi* avec *L. monocytogenes*.

- *Sérotypage*

Le CNRL ne recommande pas le sérotypage. Les sera antifacteurs ne sont plus commercialisés en France depuis 2021 par les seules firmes les distribuant à ce jour (VWR), et cette information n'est pas utile pour la surveillance.

- *Antibiogramme*

Méthode de diffusion en gélose Mueller-Hinton supplémentée ou non avec 5% de sang et 20 mg/L de β -Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) incubé en aérobie avec 5%CO₂ à 35+/-1°C pendant 18+/-2h.

Principaux antibiotiques à tester : pénicilline G, amoxicilline, gentamicine, tétracycline, érythromycine, chloramphénicol, triméthoprime-sulfaméthoxazole. À noter les problèmes d'interprétation de la sensibilité aux sulfamides et dérivés sur gélose MH supplémentée au sang.

Le CNRL recommande l'utilisation du protocole EUCAST v11.0 dont les protocoles et interprétations sont disponibles à l'adresse web : http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/ qui est complété par les valeurs d'interprétation contenues dans le M45 (3rd edition, 2015) et le M100 (31th edition, 2021) du CLSI (70, 71). L'utilisation des PK/PD d'EUCAST pour les breakpoints non définis pour *Listeria monocytogenes* est à noter comme pour la gentamicine. Les concentrations minimales inhibitrices et les diamètres sont en cours d'établissement.

Les caractéristiques de performance des différentes marques de milieux de culture et de disques d'antibiotiques ainsi que les méthodes pour les évaluer sont disponibles sur le site web EUCAST.

À la demande de nombreux laboratoires correspondants, nous proposons le tableau 12 suivant d'interprétation des résultats d'antibiogrammes.

Tableau 12. Valeurs de référence pour l'interprétation des antibiogrammes pour *Listeria monocytogenes* (* selon le CLSI M45 (3rd edition, 2015) ainsi que le CLSI M100 (31th edition, 2021) et ** selon l'EU-CAST version 11.0 page 90 à http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)

Antibiotiques	Critères MIC mg/L		
	Seuil de Sensibilité	Valeurs intermédiaires	Seuil de résistance
Ampicilline**	≤ 1	-	> 1
Amoxicilline*	≤ 4	> 4 - ≤ 16	≥ 16
Benzylpenicilline**	≤ 1	-	> 1
Gentamicine*	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacine*	≤ 1	2	≥ 4
Chloramphénicol*	≤ 8	16	≥ 32
Streptomycine*	≤ 8	> 8 - ≤ 16	> 16
Méropénème**	≤ 0.25	-	> 0.25
Vancomycine*	≤ 4	8-16	≥ 32
Erythromycine**	≤ 1	-	> 1
Tétracycline*	≤ 4	8	≥ 16
Triméthoprime +Sulfaméthoxazole**	≤ 0.06 <i>(exprimé pour la concentration en Triméthoprime)</i>	-	> 0.06 <i>(exprimé pour la concentration en Triméthoprime)</i>

- *Sérodiagnostic*

Le CNRL ne peut effectuer de recommandations faute d'études prospectives sur de larges cohortes décrivant les performances des tests actuellement disponibles. Il existe des prestataires de ce service en France utilisant différents kits qui peuvent aboutir à des résultats divergents en absence d'assurance interlaboratoire de la qualité des résultats d'essais. La sérologie *Listeria* n'est pas recommandée chez la femme enceinte (dans les formes materno-fœtales (positivité faible et tardive, et faux positifs en cas de réactivation à CMV), ni dans les formes bactériémiques et septicémiques fœtales (positivité faible et tardive)), dans le contexte de diarrhées et dans les listérioses neuro-méningées (absence de production intra-thécale d'anticorps). Deux prélèvements espacés d'au moins 15 jours permettent d'évaluer la cinétique des anticorps. La sensibilité de ce test est d'environ 60 % (valeur établie à partir de quelques cas de listérioses neuro-méningées documentées par l'isolement du micro-organisme).

Une hémoculture est indiquée lors de toute infection inexpliquée de la femme enceinte. Le sérodiagnostic décrit dans le REMIC (Sérodiagnostic de la listériose, chapitre 64) n'est pas pris en compte dans la surveillance nationale (72) et ne sont plus recommandés dans les dernières éditions du REMIC. Cette méthode est disponible auprès de grand laboratoire de biologie médicale de 1^{er} intention.

On peut citer comme méthodes pouvant être effectuées dans des laboratoires spécialisés :

- La méthode développée par le service de microbiologie à l'Hôpital Necker-Enfants Malades qui repose sur la réalisation d'un dot-blot pour détecter les anticorps totaux anti-lystériolysine O (LLO) grâce à des antigènes purifiés d'un fragment de la protéine, LLO-411 (73). Des titres de 1/100 à 1/5000 sont constatés dans l'infection aiguë. La positivité semble le plus souvent associée à une infection évolutive avec foyers profonds notamment dans les cas d'encéphalite et des infections évoluant depuis plusieurs jours, car la séroconversion semble tardive notamment dans le cas des infections materno-fœtales. Dans le cadre de patients septicémiques, ses performances semblent moindres. Compte tenu d'une possible réactivité aux dilutions faibles (à rapporter à de possibles immunisations antérieures asymptomatiques), il est indispensable de réaliser deux tests à 15 jours d'intervalle pour affirmer une séroconversion. La séroconversion affirme une infection invasive récente.
- La méthode de séroagglutination avec des anticorps contre des bactéries tuées : kit commercial Dade Berhing (Suspensions de *Listeria* O et H pour la réaction de Gruber-Widal). Une séroconversion ou un titre d'anticorps agglutinants de 1/320 à 1/640 au-delà de 10 jours d'infection sont à prendre en considération. La sérologie pratiquée sur les sérogroupes I et IV à un intérêt rétrospectif et manque de spécificité en raison de l'existence de réactions croisées avec d'autres bactéries Gram positif (staphylocoques, entérocoques). Un taux isolé d'anticorps supérieur ou égal à 1280, ou une augmentation du titre de 4 dilutions en 2 à 3 semaines peut être un argument en faveur d'une listériose, en confrontation avec le tableau clinique.
- La méthode DIATHEVA (Fano, Italie) qui est un ELISA commercial pour la détection des IgG anti-LLO dans le sérum humain et le plasma. Ce kit n'a pas encore été évalué d'après la littérature.

- *Méthodes de PCR*

Le CNRL ne peut formuler de recommandations, faute d'études prospectives sur de larges cohortes de patients décrivant les performances des tests de détection moléculaire de *Lm* disponibles. Il semble néanmoins pour les PCR sur LCR qu'une qPCR spécifique *Lm* (gène *hly*) soit plus sensible qu'une PCR 16S ADNr (Données préliminaires du projet Monalisa). Ainsi, les résultats de la PCR ne sont pas pris en compte à ce jour dans la surveillance nationale.

Suite à la demande de la cellule interministérielle *Listeria* en 2017 sur le questionnement des LABM français sur les kits ou méthodes utilisées pour le diagnostic de *Lm* sur LCR ou autres fluides biologiques afin de reconnaître ces dernières méthodes pour la définition des cas, le CNRL a interrogé le réseau de biologistes français R2M auquel il participe et les réponses suivantes ont été données :

- La méthode de détection qualitative par qPCR de l'ADN de *Lm* en échantillons cliniques la plus utilisée et sous accréditation est le kit RealCycler LIST-U/LIST-G (Orgentec SASU, Trappes) ;
- La méthode de PCR syndromique sur LCR avec le kit Filmarray Méningites/Encéphalites (bioMérieux, Marcy l'Etoile) (2-6, 74-76). La limite de détection (LOD) de la méthode signalée par le fabricant est de 1000 UFC/ml, mais elle peut atteindre 250 UFC/ml lors de la vérification de l'implémentation de la méthode dans le laboratoire ;
- pour les PCR syndromiques sur sang avec le kit Filmarray Blood Culture Identification (BCID, bioMérieux, Marcy l'Etoile) (75).

Pour les PCR syndromiques, les résultats doivent être toujours confrontés aux données clinico-biologiques du patient.

En microbiologie vétérinaire

Le CNRL recommande de suivre les instructions du chapitre 3.9.6. *Listeria monocytogenes* du Manuel des tests de diagnostics et des vaccins pour les animaux terrestres 2019 de l'Office International des Epizooties téléchargeables à l'adresse :

https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.09.06_LISTERIA_MONO.pdf

En microbiologie des aliments

Conformément au règlement européen EC 2073/2005 modifié, le CNRL recommande en France de suivre la norme de référence pour les prélèvements de l'environnement NF ISO 18593 : 2018 Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons, et les normes de référence pour la détection et l'énumération de *Listeria* spp. et *Listeria monocytogenes* :

- NF EN ISO 11290-1 : 2017 : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. - Partie 1 : méthode de recherche ;
- NF EN ISO 11290-2 : 2017 : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. - Partie 2 : méthode de dénombrement.

Les méthodes alternatives validées selon l'EN ISO 16140-2 : 2016 par AFNOR certification et par Microval sont actualisées et disponibles sur les sites respectifs :

<https://nf-validation.afnor.org/domaine-agroalimentaire/>

<https://microval.org/>

Concernant les méthodes commerciales d'identification des *Listeria*, le CNRL recommande l'utilisation de la galerie API *LISTERIA* (bioMérieux) ainsi que le Vitek 2 (bioMérieux) (77) et comme alternative la galerie MICROBACT 12L (Oxoid), il recommande à ses laboratoires correspondants ou interlocuteurs de se conformer aux recommandations émanant du Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* situé à l'ANSES-LSA (Maisons-Alfort). Le système MALDI-TOF MS Bruker Daltonics avec la méthode MALDI Biotyper peut être également utilisé avec de préférence une extraction totale des protéines ou par un dépôt direct pour une identification des principales espèces de *Listeria* isolées en France (Méthode validée en 2018 Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) International : OMA#2017.10. First Action ; en 2018 par Microval Certificate N°2017LR75) (7).

ANNEXE C : DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES RESPONSABLES

Déclaration Publique d'Intérêts

Le 02/03/2021 09:50:05

Je soussigné(e) **LECUIT MARC**

Reconnais avoir pris connaissance de l'obligation de déclarer tout lien d'intérêts, direct ou par personne interposée, que j'ai ou ai eu au cours des cinq dernières années, avec les entreprises, établissements ou organismes dont les activités, les techniques et les produits entrent dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes au sein duquel/desquels j'exerce mes fonctions ou ma mission, ou de l'instance/des instances collégiale(s), commission(s), conseil(s), groupe(s) de travail dont je suis membre ou auprès duquel/desquels je suis invité(e) à apporter mon expertise, ainsi qu'avec les sociétés ou organismes de conseil intervenant dans les mêmes secteurs.

Il m'appartient, à réception soit de l'ordre du jour de chaque réunion pour laquelle je suis sollicité(e), soit de l'expertise que l'organisme souhaite me confier, de vérifier si l'ensemble de mes liens d'intérêts sont compatibles avec ma présence lors de tout ou partie de cette réunion ou avec ma participation à cette expertise. En cas d'incompatibilité, il m'appartient d'en avertir l'interlocuteur désigné au sein de l'institution et, le cas échéant, le président de séance avant sa tenue. En cas de conflits d'intérêts, ma présence est susceptible d'entacher d'irrégularité les décisions, recommandations, références ou avis subséquents et d'entraîner leur annulation.

J'indique mon numéro RPPS (répertoire partagé des professionnels de santé), si je suis un professionnel de santé : 10001562684

Je m'engage à actualiser ma DPI à chaque modification de mes liens d'intérêts. En l'absence de modification, je suis tenu(e) de vérifier ma DPI au minimum annuellement.

Article L. 1454-2 du code de la santé publique : « Est puni de 30 000 euros d'amende le fait pour les personnes mentionnées au I et II de l'article L. 1451-1 et à l'article L. 1452-3 d'omettre, sciemment, dans les conditions fixées par ce même article, d'établir ou de modifier une déclaration d'intérêts afin d'actualiser les données qui y figurent ou de fournir une information mensongère qui porte atteinte à la sincérité de la déclaration. »

Liste des missions/fonctions

Institution :

Santé Publique France (SPF)

Instance:

RESPONSABLES CNR MANDAT 2017-2022

Mandat :

Autre - Non renseignée

Institution :

Direction Générale de la Santé (DGS)

Instance:

Comité Analyse Recherche et Expertise

Mandat :

Membre - Non renseignée

1. Activité(s) principale(s), rémunérée(s) ou non, exercée(s) actuellement et au cours des 5 dernières années, à temps plein ou à temps partiel

Activité(s) salariée(s)

HÔPITAL NECKER - ENFANTS MALADES

Adresse : 149, rue de Sèvres 75015 PARIS 15 FRANCE

Fonction : PUPH, Adjoint au Chef de Service

Période : 01/2006 à aujourd'hui

Autre (activité bénévole, retraité...)

RESPONSABLE DU DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET INFECTION

Adresse : Institut Pasteur 75015 PARIS 15 FRANCE

Période : 01/05/2019 à aujourd'hui

RESPONSABLE D'UN LABORATOIRE

Adresse : INSERM

Période : 01/2006 à aujourd'hui

RESPONSABLE D'UN LABORATOIRE

Adresse : INSTITUT PASTEUR

Période : 01/2008 à aujourd'hui

RESPONSABLE DU CNR LISTERIA

Adresse : Institut Pasteur

Période : 01/2008 à aujourd'hui

2. Activité(s) exercée(s) à titre secondaire

2.1. Participation à une instance décisionnelle d'un organisme public ou privé dont l'activité, les techniques ou les produits entrent dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.2. Activité(s) de consultant, de conseil ou d'expertise exercée(s) auprès d'un organisme public ou privé entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

COMITÉ ANALYSE RECHERCHE ET EXPERTISE (CARE)

Fonction occupée : Membre

Sujet : COVID-19

Rémunération : aucune

Période : 24/03/2020 à aujourd'hui

INSERM

Fonction occupée : Conseil

Sujet : Participation à des jurys d'évaluation

Rémunération : aucune

3/5

Période : 01/2009 à aujourd'hui

INSTITUT PASTEUR

Fonction occupée : Conseil

Sujet : Participation à des jurys d'évaluation

Rémunération : aucune

Période : 01/2011 à aujourd'hui

2.3. Participation(s) à des travaux scientifiques et études pour des organismes publics ou privés entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

2.3.1 Participation à des essais et études

INST. PASTEUR CNR LISTERIA

Organisme financeur : INST. PASTEUR CNR Listeria

Sujet : Recherche clinique - Facteurs de risque et facteurs pronostics de listériose - étude observationnelle nationale prospective

Type d'étude : Etude multicentrique

Votre rôle : Investigateur principal

Rémunération : aucune

Période : 11/2009 - 07/2013

2.3.2 Autres travaux scientifiques

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.4. Rédaction d'article(s) et intervention(s) dans des congrès, conférences, colloques, réunions publiques diverses ou formations organisés ou soutenus financièrement par des entreprises ou organismes privés entrant dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

2.4.1 Rédaction d'article(s)

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.4.2 Intervention(s)

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

2.5. Invention ou détention d'un brevet ou d'un produit, procédé ou toute autre forme de propriété intellectuelle non brevetée en relation avec le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

3. Direction d'activités qui ont bénéficié d'un financement par un organisme à but lucratif dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiales, objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

4. Participations financières directes, sous forme d'actions ou d'obligations détenues et gérées directement ou de capitaux propres dans le capital d'une société dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiales, objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

5. Proches parents ayant des activités ou des intérêts financiers dans toute structure dont l'objet social entre dans le champ de compétence, en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, de l'organisme/des organismes ou de l'instance/des instances collégiale(s), objet(s) de la déclaration

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

6. Fonctions et mandats électifs exercés actuellement

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

7. Autre lien, dont vous avez connaissance, qui est de nature à faire naître des situations de conflits d'intérêts

X Je n'ai pas de lien d'intérêts à déclarer dans cette rubrique

ANNEXE D : AUTRES INFORMATIONS

D.1. PERMANENCE DU CNR

Le CNRL est ouvert du lundi au vendredi de 9H00 à 18H00. En dehors des heures ouvrées, les responsables peuvent être joints par téléphone (A. LECLERCQ : 0622212633) et sont destinataires des mails listeria@pasteur.fr
Les envois d'échantillons sont réalisables 24h/24h et 7j/7j. Un cadre et un technicien peuvent intervenir de weekend si nécessaire.

D.2. AUTORISATION MOT

Le genre *Listeria* ne contenant pas de MOT listés à l'article L5139-1 du Code de la Santé Publique, le CNRL n'est pas soumis à cette réglementation.

D.3. AUTORISATIONS D'EXERCER LA BIOLOGIE MEDICALE

Les deux signataires des comptes rendus et rapports d'essais du CNRL sont le responsable du CNRL, Marc Lecuit (signature au sein d'un CNR depuis 2008) et le responsable Adjoint, Alexandre Leclercq (signature au sein d'un CNR depuis 2007). Ceci a été évalué dans le cadre de l'évaluation technique d'accréditation COFRAC de 2019.
Ces personnes sont reconnues comme pouvant exercer la biologie médicale dans un domaine de spécialisation déterminé (Art.L. 6213-2 de l'Ordonnance N°2010-49 du 13 Janvier 2010 relative à la biologie médicale) et donc n'ont pas de dossiers d'autorisation à exercer la biologie médicale de déposés auprès de la Commission nationale de biologie médicale (CNBM).