



**CENTRE NATIONAL
DE REFERENCE
DES *LISTERIA***

DATE : Avril 2015

RESPONSABLE :	Marc LECUIT
RESPONSABLE ADJOINT :	Alexandre LECLERCQ
INGENIEUR :	Viviane CHENAL-FRANCISQUE
MEDECIN CHERCHEUR :	Caroline CHARLIER-WOERTHER
TECHNICIENS :	Hélène BRACQ-DIEYE Anne MORVAN/Pierre THOUVENOT Morgane LAVINA
SECRETAIRE :	Martine BELIN/Alexandra BERNARD

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 des 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 (M. Lecuit, C. Charlier and A. Leclercq. 2015. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Listeria – Année 2014. Institut Pasteur, Paris, France) dont elles sont issues.

Avant-propos

Le Centre National de Référence des *Listeria* remercie l'ensemble de ses correspondants et partenaires pour l'envoi en 2014 de souches et de renseignements permettant de remplir sa mission de surveillance microbiologique de la listériose en France et d'établir ce rapport.

RESUME DE L'ANNEE 2014

En 2014, le nombre total de souches humaines et non humaines réceptionnées au Centre National de Référence *Listeria* (CNRL), hors projets de recherche, a augmenté de 11% (1894 souches), avec une stabilité du nombre de souches humaines (368). Le CNR a caractérisé et typé l'ensemble de ces souches dans le cadre de sa mission de surveillance microbiologique de la listériose. Ces activités ont été rendues conformes à la norme d'accréditation EN ISO 15189 en Octobre 2014 pour son évaluation par le COFRAC prévue en Juin 2015.

Le CNRL a été sollicité par les autorités sanitaires françaises pour la gestion d'alertes sur des produits contaminés en France et dans le cadre d'alertes européennes et internationales. En 2014, une épidémie a été investiguée avec les autorités compétentes, conduisant à l'identification de la contamination de l'environnement d'un atelier de production.

En 2014, le CNRL a échangé des informations avec les structures de surveillance européennes de la listériose par le biais de la plateforme EPIS (Epidemic Intelligence Information System) de l'ECDC lors des alertes sanitaires européennes, et avec la nouvelle surveillance microbiologique moléculaire européenne par le biais des programmes TESSY (The European Surveillance System) et ELITE (European *Listeria* Typing Exercise). Le CNRL / CC-OMS *Listeria* a participé à l'investigation de 7 épidémies, à une métaanalyse de l'impact de la listériose au niveau mondial et à l'échange d'expériences entre les systèmes de surveillance de la listériose français et américain (CDC).

Le CNRL participe à la détection des cas groupés et à l'identification de la source de contamination, en lien avec l'InVS et les autres partenaires de la cellule *Listeria*. Le CNRL a développé un nouvel outil de typage par PCR multiplexe des souches de *L. monocytogenes* et développe une méthode de typage fondée sur l'étude du core génome de *Listeria monocytogenes* (core genome MultiLocus Sequence Typing), avec l'Unité de Biologie des Infections et l'Unité de génomique évolutive des microbes, et en lien avec le CDC (Atlanta), le SSI (Danemark), Santé Canada, et le PHE (Grande Bretagne).

La caractérisation moléculaire des souches de *L. monocytogenes* est primordiale pour l'investigation des cas groupés et des épidémies, ainsi que l'identification du véhicule alimentaire à l'origine des cas humains. Elle permet également d'analyser la biodiversité de cette espèce bactérienne. Le CNRL a poursuivi l'analyse des génomes d'un échantillon de souches cliniques, alimentaires et environnementales représentatives, afin d'étudier la biodiversité et l'évolution de *L. monocytogenes*, de caractériser l'émergence éventuelle de clones d'intérêt épidémiologique, médical et microbiologique, de mieux comprendre les bases moléculaires de la virulence de cette espèce bactérienne.

Afin de mieux caractériser les formes cliniques de la listériose, d'en préciser les modalités diagnostiques et thérapeutiques et d'identifier des facteurs de risque et pronostiques, l'étude prospective cas-témoins MONALISA (clinical trials NCT01520597) a été initiée fin 2009. Le recrutement s'est poursuivi, permettant l'inclusion d'un total de 427 cas de septicémie, 252 cas d'infection du système nerveux central et 107 cas d'infection materno-fœtale. Financée initialement par le programme hospitalier de recherche clinique national (PHRC), elle permet de mieux caractériser et comprendre cette infection sévère. L'analyse des données recueillies est en cours. Cette étude cas-témoins permettra également d'évaluer l'apport éventuel de nouvelles techniques diagnostiques. Le CNRL participe également à un projet financé par le fonds national suisse de la recherche scientifique (Sinergia) qui étudie en collaboration avec la Faculté Vétérinaire de Bern (Suisse) la neurolistériose humaine et animale.

En lien avec l'Unité de Biologie des Infections, auquel il est affilié, le CNRL participe également à l'étude de la physiopathologie de la listériose. Le CNRL participe à des travaux visant à améliorer l'identification et la caractérisation des souches (caractérisation des facteurs de virulence, étude de la biodiversité et de la structure génétique des espèces du genre *Listeria* et de leur évolution), et à comprendre la physiopathologie de la listériose.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION : LA LISTERIOSE.....	7
2. ACTIVITES DE SURVEILLANCE	9
2.1. SURVEILLANCE DE LA LISTERIOSE HUMAINE EN FRANCE	9
2.2. INTERACTIONS DU CNR AVEC LES DIFFERENTS ACTEURS NATIONAUX ET INTERNATIONAUX	14
2.3. DONNEES DE LA SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE HUMAINE.....	16
2.4. CARACTERISATION DES SOUCHES D'ORIGINE NON HUMAINE REÇUES AU CNRL	38
2.5. BILAN DES INVESTIGATIONS, DEPASSEMENTS DE SEUIL ET ALERTES	44
3. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	50
3.1. CENTRE DE DOCUMENTATION	50
3.2. SITE INTERNET.....	50
3.3. VEILLE INTERNET	50
3.4. ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS, ACCUEIL DE STAGIAIRES.....	50
3.5. PARTICIPATION A LA REDACTION DE COMMUNICATIONS ECRITES DIDACTIQUES.....	51
3.6. ACTIVITE DE CONSEIL.....	51
3.7. EXPERTISES.....	52
3.8. RETOUR D'INFORMATIONS	53
4. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNRL.....	54
4.1. CONTRIBUTIONS AUX ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES	54
4.2. ANALYSES CLINIQUES	55
4.3. METHODES DE DIAGNOSTIC ET ATYPIES DES SOUCHES	57
4.4. ETUDES DE LA VIRULENCE.....	58
4.5. TAXONOMIE	59
4.6. DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE TYPAGE MOLECULAIRE	59
4.7. ETUDE DE LA DIVERSITE DES <i>LISTERIA</i>	59
4.8. ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	60
4.9. PROJETS COLLABORATIFS.....	60
5. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	61
5.1. PUBLICATIONS NATIONALES	61
5.2. PUBLICATIONS INTERNATIONALES	61
5.3. CHAPITRES DE LIVRES	62
5.4. COMMUNICATIONS NATIONALES.....	62
5.5. COMMUNICATIONS INTERNATIONALES.....	62
5.6. CONFERENCES SUR INVITATIONS	64
5.7. PRESENCE DANS LES MEDIAS	64
6. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2015-2016.....	65
7. REFERENCES.....	66
ANNEXE A. HISTORIQUE ET MISSIONS DU CNRL.....	69
A.1. HISTORIQUE	69
A.2. LES MISSIONS SPECIFIQUES DU CNRL.....	69
ANNEXE B : ORGANISATION DU CNR	71
B.1. PERSONNEL PERMANENT	71
B.2. LOCAUX	73
B.3. EQUIPEMENT	74
B.4. MISE EN PLACE DE LA DEMARCHE DE MANAGEMENT DE LA QUALITE ET HYGIENE/SECURITE AU SEIN DU CNRL.....	75

ANNEXE C : ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR <i>LISTERIA</i>	78
C.1. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> : METHODES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES	78
C.2. TECHNIQUES DEVELOPPEES OU A L'ETUDE EN 2014.....	79
C.3. MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	80
C.4. DIFFUSION ET ECHANGE DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	82
C.5. TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL.....	83
ANNEXE D : LISTE COMPLEMENTAIRE DES PUBLICATIONS 2014 DE L'UNITE DE BIOLOGIE DES INFECTIONS	87

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
ARS	Agence Régionale de Santé
CES	Comité d'experts spécialisés
CCOMS	Centre Collaborateur de l'OMS des <i>Listeria</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 SANCO	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
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>
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)
N	Système nerveux central
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PFGE	Electrophorèse en champs pulsé
S	Septicémie
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TESSY	European Surveillance System

1. INTRODUCTION : LA LISTERIOSE

La listériose est une maladie infectieuse humaine d'origine alimentaire et une zoonose, dont l'agent étiologique est *Listeria monocytogenes* (*Lm*), une bactérie ubiquitaire, et dont les caractéristiques principales sont :

- l'existence d'une **population à risque** : les femmes enceintes et leurs nouveau-nés, les personnes âgées (> 70 ans) et les sujets dont l'immunité innée et/ou cellulaire est diminuée (immunosuppresseurs, corticothérapie, chimiothérapie, cancer, diabète, alcoolisme, ...)
- une **présentation clinique sous différentes formes**: la listériose peut se traduire par une gastro-entérite fébrile (GEA) isolée, une infection invasive, ou très rarement une infection focale. Les GEA résultent principalement de la contamination alimentaire massive de sujets immuno-compétents (7, 14, 46). Les formes invasives comportent les formes septicémiques (S) et les infections du système nerveux central (N), qui surviennent en règle chez des sujets immunodéprimés, et les formes materno-néonatales (MN) (24). Ces trois présentations représentent plus de 90% des formes invasives. D'autres manifestations, rares, sont parfois observées, telles que les formes cutanées isolées (23), les infections ostéo-articulaires (10), biliaires ou vasculaires;
- une **transmission par voie alimentaire** (>99 % des cas). La femme enceinte peut transmettre l'infection au fœtus *in utero* par voie transplacentaire, ou, très exceptionnellement, durant l'accouchement. La transmission directe par voie cutanée, exceptionnelle, a été observée chez les vétérinaires et fermiers après mise bas d'un animal porteur ou lors d'avortements liés à une listériose animale.
- une **morbi-mortalité très élevée** : les formes invasives non MN sont associées à une mortalité de 20 à 30% (Europe : 16%) et les formes neuroméningées représentent la quatrième cause de méningo-encéphalite en France. Elles requièrent quasi systématiquement une hospitalisation (94%), souvent prolongée et en soins intensifs (4). Les infections MN se compliquent de perte fœtale dans 25% des cas, mais sont en règle sans gravité pour la mère.
- le **coût de l'infection par patient** est élevé (36).
- l'**incidence** de la listériose en France a diminué notablement de 1987 à 2001, puis s'est stabilisée de 2001 à 2005 autour de 3,5 cas/million d'habitants. En 2006 une augmentation de l'incidence à 4,6 cas/million d'habitants a été constatée. Elle était au voisinage de 5 cas/million d'habitants de 2007 à 2014 (26, 29). Elle est évaluée en 2014 à 5,3 cas/million d'habitants. Cette incidence est du même ordre de grandeur que celle observée dans les pays bénéficiant d'un système de surveillance de l'infection.
- la listériose humaine se présente essentiellement sous forme de **cas sporadiques**, plus rarement par des cas groupés, voire de véritables **épidémies**. Plus de 88 épidémies ont été rapportées dans la littérature à ce jour dont 13 en France (Tableau 1). Celles-ci ont diminué en magnitude et en fréquence avec la mise en place des différents éléments du système de surveillance en France.

Tableau 1. Tableau récapitulatif des épidémies françaises de 1992 à 2014

Année	Nombre de cas	Aliments	Durée de l'épidémie
1992	279	Langue de porc en gelée	10 mois
1993	38	Rillettes	3,5 mois
1995	36	Brie	4,5 mois
1997	14	Pont-l'Évêque	4,5 mois
1999	4	Époisses	2 mois
2000	10	Rillettes	4 mois
2000	32	Langue de porc en gelée	3,5 mois
2002	11	Saucisse à tartiner (tartinette)	3 mois
2003	4	Mortadelle	2 mois
2012	11	Brie	3 mois
2013	3	Fromage de Brebis	2 mois
2013	11	Quenelle	4 mois
2014	6	Produits de charcuterie, Morbier Contaminés par l'environnement agro-alimentaire	3 mois

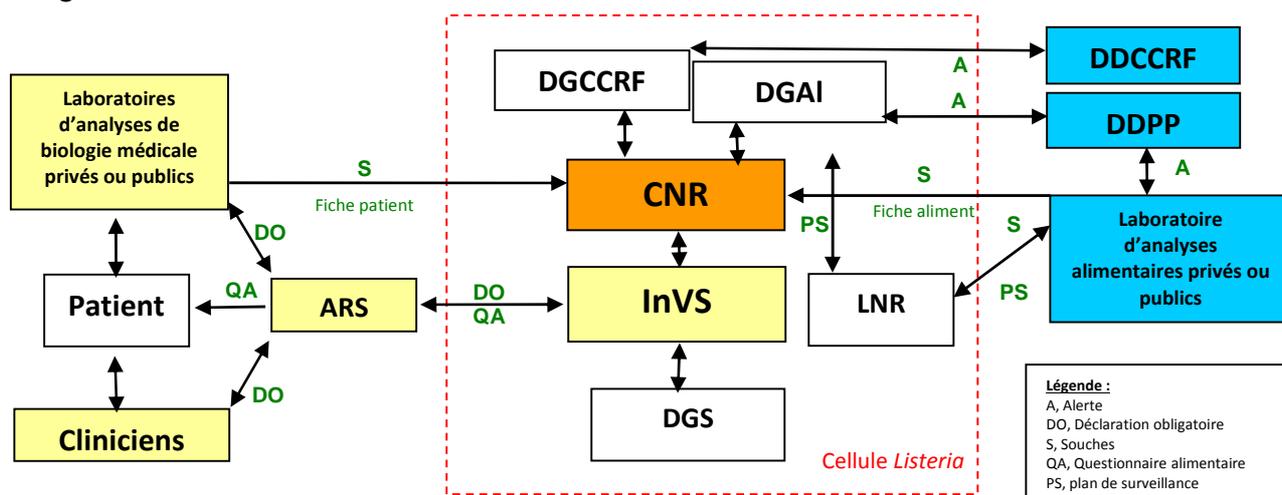
- la listériose n'est que **rarement rapportée dans les pays du Sud (16, 40)**. Sa réelle incidence y reste inconnue. Plusieurs facteurs se conjuguent pour rendre compte de ces différences entre Nord et Sud. Le manque de moyens diagnostiques et l'absence de système de surveillance, ainsi que la prévalence élevée de nombreuses autres pathologies infectieuses plus fréquentes et graves, rendent son diagnostic difficile. La population à risque de listériose y est relativement plus restreinte (âge moyen plus faible et utilisation de traitement immunosuppresseurs limitée). Enfin, il existe des différences de production et de consommation des aliments (moins de diffusion d'aliments d'origine industrielle potentiellement contaminés, moins d'utilisation et de conservation de produits réfrigérés), qui peuvent conduire à une moindre exposition de la population.

2. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

2.1. SURVEILLANCE DE LA LISTERIOSE HUMAINE EN FRANCE

Le CNRL est en charge de la surveillance microbiologique de la listériose et participe aux investigations destinées à identifier l'origine alimentaire des cas (Figure 1) (20). Cette surveillance s'effectue en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), la Direction Générale de la Santé (DGS), la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) et la Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), qui composent depuis 1992 la cellule *Listeria*, qui compte aussi depuis 2007 le Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* (LNR) situé au laboratoire de Santé animale de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES-LSA). 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.

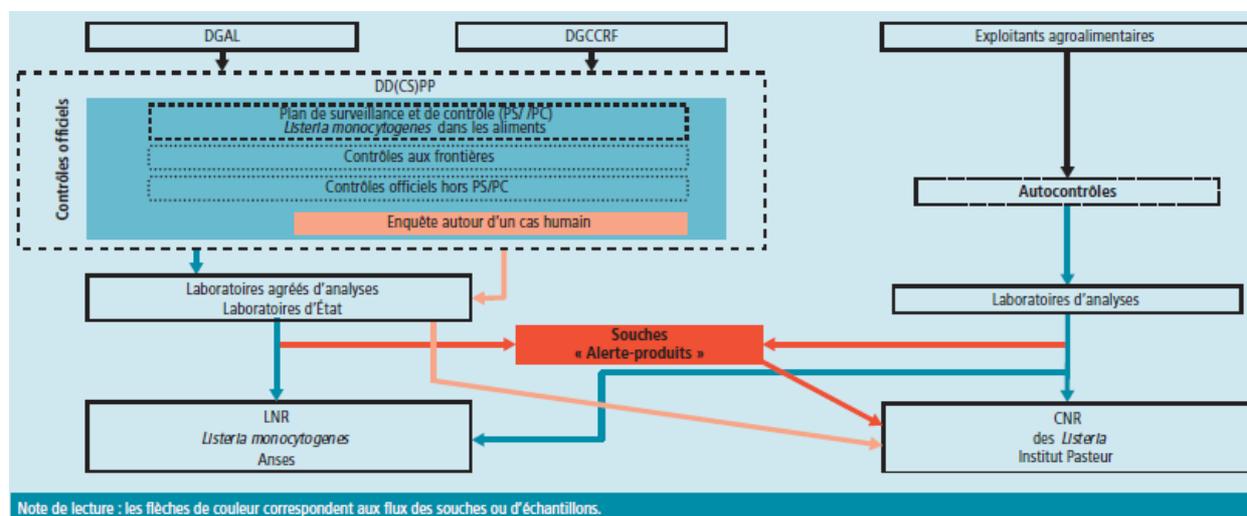
Figure 1. Schéma de fonctionnement de la cellule *Listeria*



CNR : Centre national de Référence des *Listeria* ; LNR : Laboratoire National de référence ; InVS : Institut de Veille Sanitaire ; DGAL : 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.

Au sein de la « Cellule *Listeria* », le CNRL joue un rôle scientifique, technique et d'aide à la décision. Le circuit des souches d'origine alimentaire ou environnementale a été formalisé par la cellule *Listeria* comme présenté à la Figure 2.

Figure 2. Circuit des souches sur le schéma de surveillance microbiologique français des *Listeria monocytogenes* (Source : BEH. 2012. Surveillance des *L. monocytogenes* dans les aliments. Hors Série : 41-45 (49))



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.

La surveillance effectuée par le CNRL se fonde sur la caractérisation des souches isolées de patients et adressées volontairement par les biologistes, en parallèle à la déclaration obligatoire envoyée à l'ARS. Les cas diagnostiqués par une autre technique (biologie moléculaire ou sérologie) ne sont à ce jour pas retenus dans le cadre de la DO (2), car ces méthodes n'ont pas été formellement validées. La PCR *hly* est cependant très spécifique et peut constituer une aide diagnostique pour le clinicien, notamment dans les formes neuroméningées. Ce n'est pas le cas des tests sérologiques qui ne seront plus recommandés par le référentiel en Microbiologie (REMIC) en 2015. Le CNRL caractérise également les souches alimentaires et environnementales qui lui sont adressées dans le cadre du système de surveillance.

L'activité de surveillance du CNRL consiste à :

1. Confirmer l'identification de la souche ;
2. Analyser les caractéristiques microbiologiques (sérotipe, groupe PCR, profils de macrorestriction d'ADN, sensibilité aux antibiotiques) des souches isolées de cas humains, d'aliments ou d'environnement agro-alimentaires;
3. Recueillir les informations cliniques associées aux cas ou aux souches d'aliments ou d'environnement agro-alimentaires au moyen d'une fiche de renseignements.

Ces éléments permettent :

1. d'identifier les souches doublons (patients transférés dans différents hôpitaux, couples mère-enfant comptant pour une seule infection, 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 de cas qui lui sont liés;
4. de participer à l'étude des phénomènes épidémiques en lien avec l'InVS: identification des cas épidémiques, du véhicule alimentaire, caractérisation de la souche épidémique.

SURVEILLANCE ET DEPASSEMENT DE SEUIL

Plusieurs étapes successives d'alerte sont définies :

1. Définition de profil rare, fréquent et endémique :

Un profil de macrorestriction d'ADN (PFGE), ou pulsotype, est défini comme « rare » lorsqu'il est associé à moins de 6 cas de listériose humaine par an. Il est qualifié de « fréquent » lorsqu'entre 6 et 12 cas par an sont associés à ce pulsotype, et « endémique » lorsqu'il y a plus de 12 cas par an associés. Les pulsotypes endémiques sont actuellement au nombre de 3 (M-IVb-210792-210792, M-IVb-200792-200792 et M-IVb-151005-151005). Cette classification des profils est propre au système français de surveillance et est obtenu grâce à l'exhaustivité de la réception des souches humaines au CNRL.

2. Dépassement de seuil (« cas groupés »)

Un dépassement de seuil est défini par la survenue de 3 cas de listériose sur 6 semaines dus à des souches de même groupe PCR et de pulsotype rare ou fréquent similaires. Deux pulsotypes sont dits similaires s'ils diffèrent d'une bande en position ou en présence pour les enzymes de restriction *Ascl* et/ou *Apal*. Le seuil retenu pour définir un dépassement de seuil en cas de pulsotype endémique est de 6 cas en 6 semaines (Décision Cellule *Listeria*, 2012). Le CNRL effectue chaque semaine un rapport sur chaque dépassement de seuil par courrier électronique aux autres membres de la Cellule *Listeria* regroupant les informations sur les souches humaines impliquées, leur fréquence mensuelle depuis la première détection du profil dans la base de données du CNRL/CCOMS et les souches alimentaires reçues les 6 derniers mois ayant les mêmes caractéristiques microbiologiques.

3. Surveillance renforcée

Tout dépassement de seuil est suivi d'une phase de surveillance renforcée durant laquelle le CNRL signale toute nouvelle souche d'origine humaine ou alimentaire similaire à celle du dépassement de seuil, tandis que l'InVS 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 lorsque plus aucun nouveau cas dû à une souche avec des caractéristiques microbiologiques identiques à celle du dépassement de seuil n'est détecté pendant 6 semaines. Le CNRL informe alors la Cellule *Listeria* de la clôture du dépassement de seuil et ne signale plus, sauf avis contraire de la cellule *Listeria*, les cas humains avec une souche identique.

4. la 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

Une épidémie correspond à un excès de cas de listériose, liés à une souche définie, le plus souvent en rapport avec une exposition précise, identifiée ou non. La déclaration d'épidémie est décidée par la Cellule *Listeria*, et tient compte de la distribution des cas dans le temps et sur le territoire. De façon

schématique, si les cas possiblement liés à une même source sont regroupés dans le temps et l'espace, il est considéré qu'il s'agit de cas groupés (cf définition ci-dessus), alors que s'il existe une distribution relativement large dans le temps et l'espace, une épidémie pourra alors être déclarée. Un cas isolé, survenant en dehors de cas groupés ou d'épidémie, est qualifié de sporadique. La très grande majorité des cas de listériose identifiés par la déclaration obligatoire en France sont sporadiques.

6. Toxi-infection alimentaire collective

Il s'agit de la survenue d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

SURVEILLANCE ALIMENTAIRE

Les alertes-produits

Une alerte-produit est lancée quand une denrée alimentaire non-conforme aux critères microbiologiques de sécurité du règlement européen 2073/2005 modifié (100 UFC/g ou absence/présence) (5, 6), 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) (5, 6). Le CNRL effectue chaque semaine un rapport transmis par courrier électronique aux membres de la Cellule *Listeria*, concernant les souches d'alertes-produits. Il regroupe les informations sur ces souches, indique la fréquence des pulsotypes correspondants parmi les souches humaines depuis son premier archivage dans la base de données du CNR/CCOMS, et liste les souches humaines des 3 derniers mois avec les mêmes caractéristiques microbiologiques. L'InVS investigate cette alerte-produit si les pulsotypes sont rares ou pour un pulsotype fréquent ou endémique qui est en cours d'investigation et pour lequel aucune source n'est encore identifiée.

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 les pulsotypes 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.

SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

La surveillance de la résistance de *Lm* aux antibiotiques est effectuée pour 23 antibiotiques (céfotaxime, sulfonamides, kanamycine, clindamycine, rifampicine, tétracycline, erythromycine, chloramphénicol, ciprofloxacine, moxifloxacine, levofloxacine, linézolide, triméthoprim, 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 détaillée dans l'annexe C. Les résultats de la surveillance des souches d'origine humaine isolées en 2014 sont présentés dans le chapitre 2.3.

DETECTION ET ANALYSE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES

Le caractère nosocomial des infections à *Lm* est difficile à établir, car l'incubation de la listériose peut être longue (27) 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, huile de soins).

Le CNRL détecte par le biais d'un système d'alerte automatisée au sein de sa base de données les suspicions d'infections nosocomiales, définies par l'identification de plus de 2 cas en moins de 15 jours dans un même établissement de santé. Cette identification déclenche une notification à l'InVS et la comparaison des caractéristiques microbiologiques des souches concernées. Si les caractéristiques microbiologiques des souches sont identiques ou similaires, une enquête impliquant l'InVS, l'ARS, la DGAI/DDPP et le CNRL ainsi que le CLIN et l'hygiéniste hospitalier concernés est conduite pour identifier l'origine de l'infection.

Les cas de bactériémie ou de formes 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.

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN EUROPE

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 pays européens, mais également aux USA, au Canada, à l'Australie, la Nouvelle-Zélande, l'Afrique du Sud, la Turquie, l'Islande, la Norvège, le Liechtenstein et le Japon. Ce système permet un échange de données de typages et d'informations concernant les cas groupés et les épidémies.

La base européenne ECDC TESSY (European Surveillance System) regroupe les données épidémiologiques transférées de façon volontaire et non exhaustive par les agences de santé publique nationales. Cette base est complétée par TESSY MOL, dont l'objectif est de lier les données épidémiologiques des cas humains aux données microbiologiques correspondantes (génométypage et typage moléculaire PFGE) dans le but de rendre possible une surveillance microbiologique européenne et une détection précoce des cas groupés ou épidémies au sein des pays participants, en lien avec la plateforme EPIS.

Le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE) pour *Lm* coordonne un réseau de laboratoires nationaux de référence dont les méthodes de détection et d'énumération des *Lm* dans les échantillons de la chaîne alimentaire et de l'environnement agro-alimentaire, et les méthodes de typage moléculaire PFGE ont été harmonisées. Une base de données, sous l'égide de la DG-SANCO de l'Union Européenne, a été créée.

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE INTERNATIONALE DE LA LISTERIOSE

L'Unité de Biologie des Infections héberge le Centre Collaborateur de l'OMS des *Listeria* (<http://www.pasteur.fr/ccoms/listeria>; http://apps.who.int/whocc/Detail.aspx?cc_ref=FRA-118&cc_city=paris&).

Ce mandat a été renouvelé le 30 novembre 2011 pour une période de 4 ans, sur les termes de référence (missions) suivants :

- Contribuer aux efforts de l'OMS dans la surveillance internationale de la listériose ;
- Travailler avec l'OMS sur l'épidémiologie de la listériose ;
- Contribuer à la collecte de données pour les travaux OMS de l'analyse du risque ;
- Contribuer avec l'OMS au contrôle de la résistance des *Listeria* aux agents antimicrobiens ;
- Assister l'OMS dans le soutien et l'aide à la prévention de la listériose.

Le CCOMS peut constituer un appui scientifique et technique pour l'OMS et la FAO en cas d'épidémies ou de cas groupés au niveau international, et émettre des recommandations, avis ou rédiger des documents d'informations.

En 2012, le CCOMS des *Listeria* a constitué un réseau international des Centres et Laboratoires de Référence des *Listeria* (41 pays membres à ce jour) pour contribuer à la surveillance microbiologique internationale des *Listeria*. Cette surveillance internationale existe pour le typage moléculaire PFGE, grâce au réseau Pulsenet (34). En 2014, il a analysé les résultats de son enquête dans ce réseau et identifié les besoins de ce dernier.

En 2014, le CCOMS a participé à l'investigation de 7 épidémies (USA, Suède, Suisse, Danemark, Angleterre, République de Macédoine, Portugal) et a participé au développement et validation d'une nouvelle méthode de typage moléculaire basé sur la génomique : le cgMLST (core genome MLST) pour remplacer la méthode de référence PFGE. Le CCOMS a également assisté le WHO FERG (Foodborne Diseases Epidemiology Reference Group) en procurant des données épidémiologiques sur la listériose dans le cadre d'une méta-analyse pour établir un point épidémiologique international sur la listériose (16, 40).

2.2. INTERACTIONS DU CNR AVEC LES DIFFERENTS ACTEURS NATIONAUX ET INTERNATIONAUX

InVS : Le CNRL est en lien quotidien avec l'InVS pour la surveillance nationale et le suivi de dossiers de souches humaines ou d'investigations, et pour la gestion de phénomènes anormaux.

En 2014, le CNRL a présenté à l'INVS ses travaux sur le passage à une surveillance microbiologique de la listériose basée de Core Genome MLST (cgMLST) développé par le CNR en collaboration avec S. Brisse (Unité de Génomique évolutive des Microbes). Le CNRL a participé à un rapport d'investigation rédigé par l'INVS sur l'épidémie de 2012 liée à la consommation de Brie au lait cru.

DGS - DGAL -DGCCRF : Le CNRL est en lien plurihebdomadaire avec la DGAL dans le cadre du suivi des alertes-produits et des enquêtes sur les formes neuroméningées. 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: Le CNRL participe à l'examen de saisines DGS/DGCCRF/DGAL en tant qu'expert pour le CES « Evaluation des risques biologiques des aliments » de l'ANSES. Les CNRL et le LNRI pratiquent depuis 2008 un échange de souches de profils et d'alertes produits, et investiguent ensemble des sources possibles de contamination. Le LNRI communique lors de la surveillance microbiologique hebdomadaire les données des souches de sa base de données ayant des caractéristiques microbiologiques similaires à ceux des dépassements de seuil ouverts. En cas de nécessité, le CNRL et le LNRI dont les bases de typage moléculaire sont compatibles peuvent échanger rapidement des données de typage moléculaire dans le cadre d'investigation de cas groupés ou d'épidémies.

En 2014, 826 souches d'alertes-produits ont été envoyées par le CNRL au LNRI. Les profils PFGE *Ascl*/*Apal* des souches d'alertes-produits sont envoyés hebdomadairement au LNRI lors de la clôture de chaque surveillance microbiologique. Le CNRL effectue des comparaisons de profils de souches alimentaires de sa base avec celles du LNRI et réciproquement pour des clients privés. Le CNRL échange également avec les investigateurs en charge de la surveillance de la résistance aux antibiotiques des *Lm* d'origine alimentaire et animale (30).

Le CNRL et le LNRI participent à des projets de recherche communs (cf. chapitre 4).

Laboratoire de Référence des *Listeria monocytogenes* de l'Union Européenne (EU-RL): Créé en 2006 par la Commission Européenne, il est situé au laboratoire ANSES-LSA de Maisons-Alfort, également LNRI. Il s'intéresse à l'espèce *monocytogenes* du genre *Listeria*. Ses missions concernent les souches alimentaires et vétérinaires reliées aux zoonoses, 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*.

Le CNRL et l'EU-RL mènent des projets de recherche communs (cf. chapitre 4), dont un projet commençant en 2014 sur les critères de performance des méthodes de détection/énumération des *Listeria* spp. en Microbiologie de la chaîne alimentaire par rapport aux nouvelles espèces de *Listeria*.

European Center for Diseases Control (ECDC) : Le CNRL a participé ou contribué activement en 2014:

- aux groupes de travail *Listeria* du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire (FWD) de l'ECDC avec la participation au 5^{ème} Meeting (M. Lecuit) à Stockholm avec l'InVS (M. Tourdjman);
- au suivi du projet ELITE (European *Listeria* Typing Exercise) pour l'analyse des données humaines et alimentaires (Base-Line Study EFSA) et microbiologiques collectées en 2010-2011;
- à la notification des données françaises à la base ECDC TESSY (European Surveillance System), à la compatibilité de la base du CNRL avec la base Européenne TESSY Mol, et participe en relation avec l'InVS aux investigations de cas groupés ou épidémiques européens signalés par la plateforme d'échanges ECDC EPIS (Epidemic Intelligence Information System);
- à l'investigation de 2 Urgent Inquiries (Alerte européenne);
- à la révision des rapports conjoints annuels EFSA-ECDC sur les zoonoses (EU Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013) et à leur mise à jour ;
- à une revue acceptée dans Eurosurveillance avec C. Goessner de l'ECDC sur les « Urgent inquiries » en Europe entre 2008-2012 pour les maladies d'origine hydrique ou alimentaire.

Center for Diseases Control (CDC, USA) et PulseNet: Suite au rapprochement entre les systèmes français/américain de surveillance des *Listeria* entre le CNR, l'INVS et le CDC d'Atlanta, le CNRL/CCOMS a organisé une réunion en Juin 2014 comprenant l'INVS, le CDC d'Atlanta (Dr Peter Gerner-Smidt, microbiologiste, et Dr John BESSER, épidémiologiste) afin de comparer les systèmes de surveillance des *Listeria monocytogenes* en routine actuelle et ceux envisagés avec le Whole Genome sequencing en tenant compte des premières comparaisons PFGE/WGS aux USA et de l'outil de Core Genome MLST (cgMLST).

Organisation Internationale de Normalisation (ISO) et Comité Européen de Normalisation (CEN) : En 2014, le CNRL a participé avec le LNRL aux réunions Afnor V08B, CEN TC275/WG6 et ISO TC34/SC9 sur la révision des méthodes EN ISO 11290 de détection et d'énumération des *Lm* dans la chaîne alimentaire et a actualisé le schéma d'identification des souches de *Listeria* spp. Le CNRL a participé également aux réunions du groupe de travail *Listeria* du mandat M381 de la Commission Européenne pour la validation des méthodes EN ISO 11290. Il participe également au développement de la norme NF EN ISO 16140-6 sur la validation des méthodes microbiologiques de confirmation (identification, sérotypage, typage moléculaire).

Office International des Epizooties (OIE) : En mai 2014, l'OIE a publié le chapitre révisé par le CNRL avec d'autres experts sur *Listeria monocytogenes* dans le Manuel terrestre de l'OIE.

EC Rapid Alert System for Food and Feed (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'alerte (produits alimentaires à risque sur le marché nécessitant une action immédiate) et notifications informatives (détection nationale d'une alerte ayant entraîné des mesures telles que le retrait ou le refus de produits alimentaires) sont transmises aux membres du réseau (DGAL, DGCCRF, InVS) qui les communiquent au CNRL.

Ce système est complété au niveau mondial par le réseau INFOSAN de l'OMS et le CNR/CCOMS est contacté pour expertiser certaines alertes avant leur envoi sur le réseau international. En 2014, le CNRL a participé à l'investigation de quatre enquêtes RASFF.

Réseau national de laboratoires d'analyses : Le CNRL est en contact avec un réseau de 750 microbiologistes français et l'ensemble des laboratoires vétérinaires départementaux, de la DGCCRF, des laboratoires privés d'hygiène des aliments (environ 260 correspondants) dans le cadre de l'analyse des souches qui sont envoyées au CNRL et de la rétro-information décrite ci-après (cf. Chapitre 3.8).

2.3. DONNEES DE LA SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE HUMAINE

A - DEFINITION DES CAS

Les cas de listériose humaine sont arbitrairement classés en listériose materno-néonatale et listériose non materno-néonatale, selon les critères suivants :

- Un cas de **listériose materno-néonatale** est un cas où *Lm* est isolée d'une culture d'un site, le plus souvent physiologiquement stérile, de la femme enceinte, du fœtus, des prélèvements périnataux ou du nouveau-né (≤ 28 jours). La mère et l'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 ;
 - d'une **autre forme (A)**: définie par la présence de *Lm* dans un prélèvement non fécal extra-sanguin et extra-cérébral.

B - ANALYSE GLOBALE DES CAS DE LISTERIOSE

Nombre total de cas

En 2014, le CNRL a reçu 413 souches humaines (415 en 2013) rattachées à 374 suspicions d'infections humaines déclarées dont 1 cas à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* (369 en 2013). La différence observée entre nombres de souches et de cas est liée à l'existence de doublons voire triplicats de souches (n=37) par patient, non pris en compte dans l'analyse finale.

Pour 4 souches humaines, le CNRL n'a pas confirmé le diagnostic de listériose puisqu'il s'agissait d'une souche « non *Listeria* ».

En 2014, trois selles ont été expertisées (un patient ayant consommé un fromage contaminé par *L. monocytogenes* ; investigation d'une possible infection nosocomiale et recherche dans le cadre des recommandations de transplantation de microbiote fécal), mais aucune *Listeria* n'a été isolée.

En 2014, un LCR a été expertisé dans le cadre d'une enquête médico-légale sur nouveau-né. Aucun autre échantillon biologique clinique n'a été expertisé en 2014, étant donné que les recherches de *L. monocytogenes* dans les LCR sont réalisées par l'hôpital Necker Enfants malades depuis 2003 comme convenu avec l'INVS.

Au total, en 2014, le CNRL retient donc, après recoupement avec les données de l'InVS, 368 cas de listériose à *Listeria monocytogenes* et un cas de listériose à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* (368 en 2013) au jour du traitement statistique de ce rapport (Différence avec InVS : 5 cas sans souche associée à la DO, car le laboratoire correspondant n'avait pas gardé la souche): 359 en France métropolitaine et 9 dans les DROM-TOM.

Ce cas de listériose à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* a permis d'affirmer en accord entre l'INVS et l'ARS concernée que la DO *Listeria* correspond *stricto sensu* à un isolement de *Listeria monocytogenes* à partir d'un site normalement stérile, mais les cas de listériose humaine à *Listeria ivanovii* étant rares, il est important de pouvoir documenter ce type de cas, et qu'ils apparaissent dans la surveillance des listérioses.

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.

Une exhaustivité optimale est possible grâce :

- aux échanges journaliers de données entre l'InVS et le CNRL ;
- au point semestriel comparant les informations reçues par l'InVS et les souches reçues par le CNRL ;
- à la relance éventuelle des correspondants par les deux instances.

Le taux d'exhaustivité de réception des souches par rapport à l'ensemble des cas recensés est de 98,7% en 2014 (99,2% en 2013) (Figure 5).

Parmi les surveillances européennes de la listériose, la France présente un taux d'exhaustivité élevé ce qui lui permet d'établir des tendances sur ses cas de listérioses et de réaliser des analyses des cas et des souches dans le cadre de travaux de recherche.

Laboratoires expéditeurs

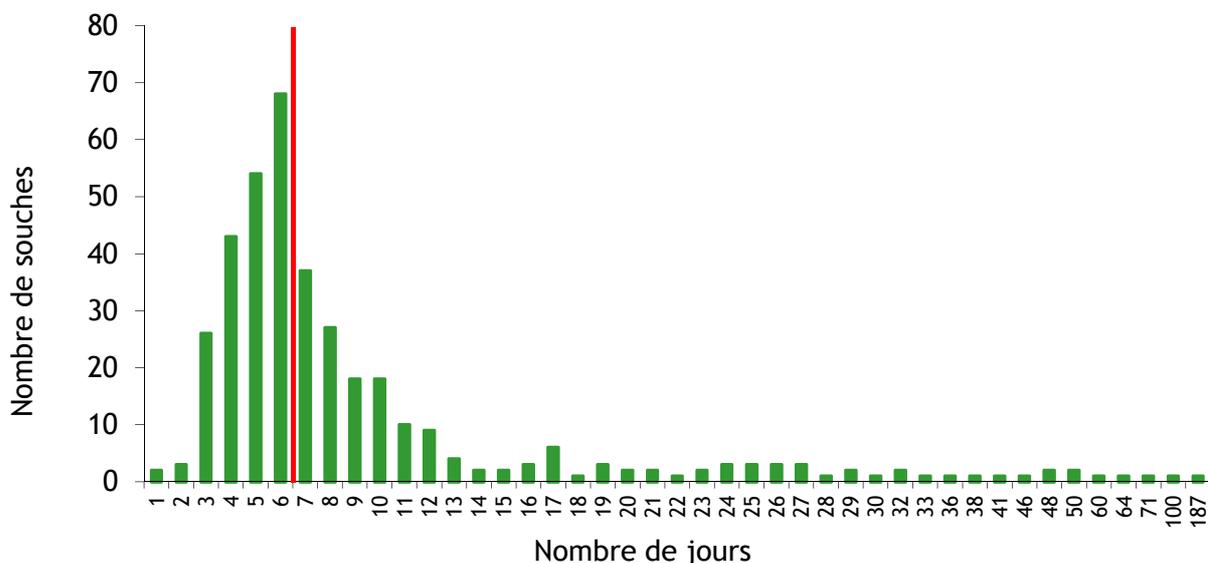
Les laboratoires expéditeurs sont à 84% hospitaliers (84% en 2013), reflétant la sévérité habituelle de l'infection. Les autres structures sont des laboratoires privés (16%) (16% en 2013). Cette répartition est équivalente à celle de 2013 et concerne la France métropolitaine et les DOM-TOM-COM.

La détermination de l'espèce à *L. monocytogenes* par les laboratoires d'analyse médicale (LABM) est à 99,2% correcte (contre 99,6% en 2013). Un LABM a bien identifié une *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* et l'a envoyée au CNRL ce qui démontre la capacité des LABM à nous rapporter des isolats d'autres espèces pour signaler un phénomène anormal.

Il faut noter que la méthode MALDI-TOF identifie bien le genre *Listeria*, mais mal l'espèce *monocytogenes*, comme cela a été décrit dans une étude à laquelle a participé le CNRL (21). En cas de résultats douteux, le logiciel d'interprétation peut demander de faire une PCR ADNr 16S ce qui allonge l'envoi de la souche au CNRL.

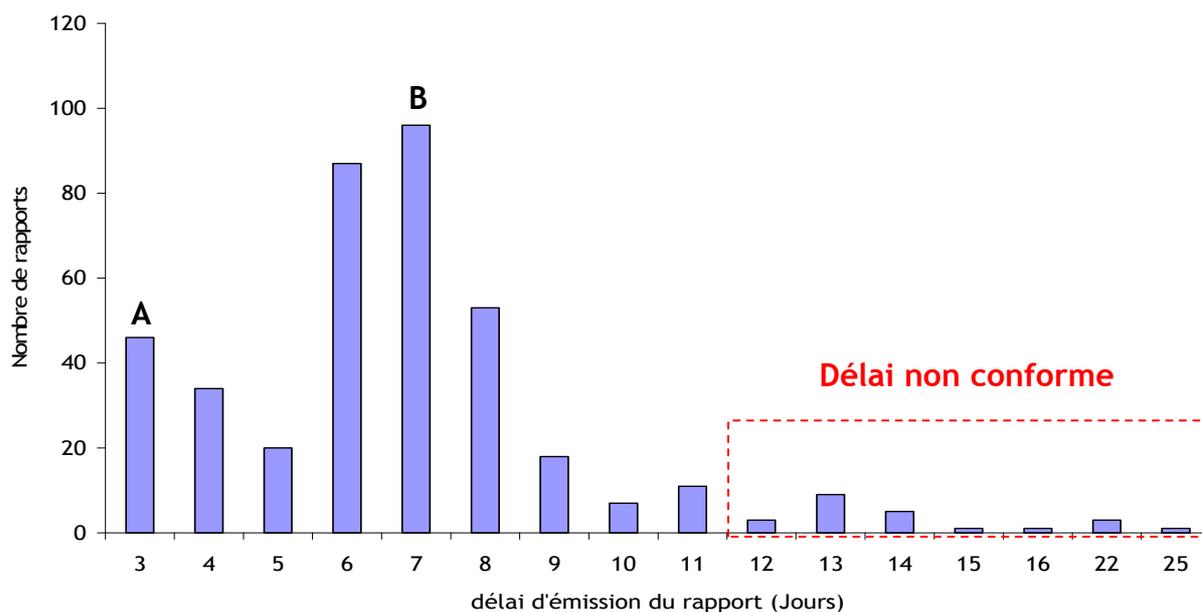
Le **délai moyen entre date du prélèvement dont la souche a été isolée et réception au CNRL** est de 10 jours (compris entre 1-187 jours) contre 9 jours depuis 2013 (Figure 3). Ce délai se stabilise ces dernières années entre 9 et 10 jours. La réduction de ce délai est un objectif du CNRL et nécessite des relances par l'InVS ainsi que les ARS et l'optimisation du système de transport pour les laboratoires ne disposant pas de circuits rapides spécifiques.

Figure 3. Distribution des souches d'origine humaine isolées en 2014 selon le délai entre le prélèvement et la réception au CNRL (médiane en rouge)



Le délai moyen entre réception de la souche au CNRL et envoi du rapport d'essai (contenant l'identification et le groupage PCR de la souche) a été de 6,8 jours (contre 6,5 j en 2013) avec un délai compris entre 1 et 25 jours (Figure 4). Le délai cible du système qualité du CNRL est de 6 jours. Conformément aux conditions analytiques du CNRL, ce délai peut s'allonger en raison de la nécessité de l'arrivée des souches après le mercredi ce qui décale le résultat à la semaine suivante (+4 jours), de purification de la souche ou de la lecture sur 5 jours de l'hydrolyse des sucres en cas de tests phénotypiques complémentaires. Les délais non-conformes ont été liés à des rapports révisés (erreurs sur la lecture des renseignements manuscrits) ou à des difficultés techniques sur la détermination de l'utilisation de sucres.

Figure 4. Distribution des souches isolées en 2014 selon le délai entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai (A, pic des rapports d'analyses sans week-end ; B, pic des rapports d'analyses avec week-end)



L'ensemble de ces résultats illustre la qualité du réseau de microbiologistes en lien avec le CNRL, leur prise en compte des enjeux de santé publique que représente l'isolement d'une *Lm*, et la contribution essentielle des microbiologistes médicaux à la surveillance microbiologique de la listériose. Cependant, le coût de l'envoi des souches semble pouvoir constituer un frein à leur envoi au CNRL.

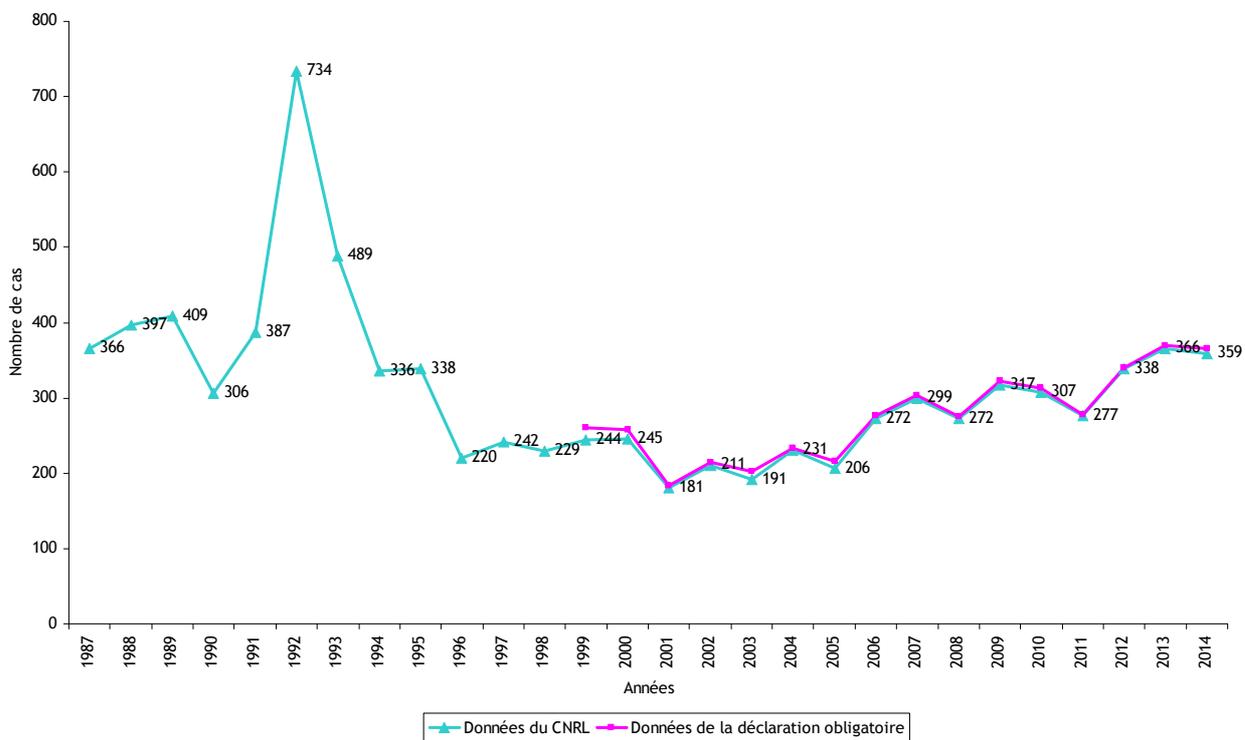
C - CAS DE LISTERIOSE EN FRANCE METROPOLITAINE

Le nombre de cas de listériose en France métropolitaine en 2013 est de 359 (Le cas rare de listériose *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ne sera pas décrit dans la suite de cette analyse), soit une baisse de 1% par rapport à 2012 (363 cas en 2012). Ceci montre une stabilité des cas en France alors qu'une augmentation du nombre de cas en Europe est constatée par l'ECDC (4).

L'évolution des 7 dernières années est marquée par 3 tendances successives, rapportées également dans le reste de l'Europe :

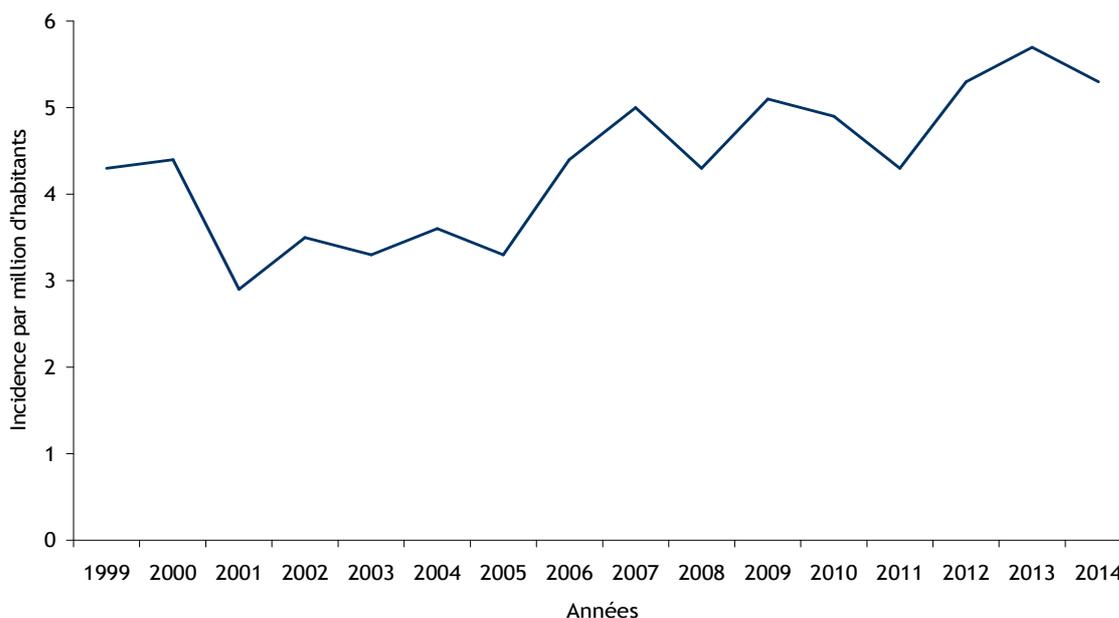
- Augmentation en 2006
- Stabilité entre 2007 et 2011
- Réaugmentation du nombre de cas en 2012, sans cause unique identifiée (ni dans le profil des souches, des contaminations alimentaires ni des patients) ainsi qu'à un niveau européen et avec un nombre total de cas proche des années épidémiques avant 1995.

Figure 5. Nombre de cas de France métropolitaine recensés par le CNRL et par la déclaration obligatoire (Source : InVS) depuis 1987



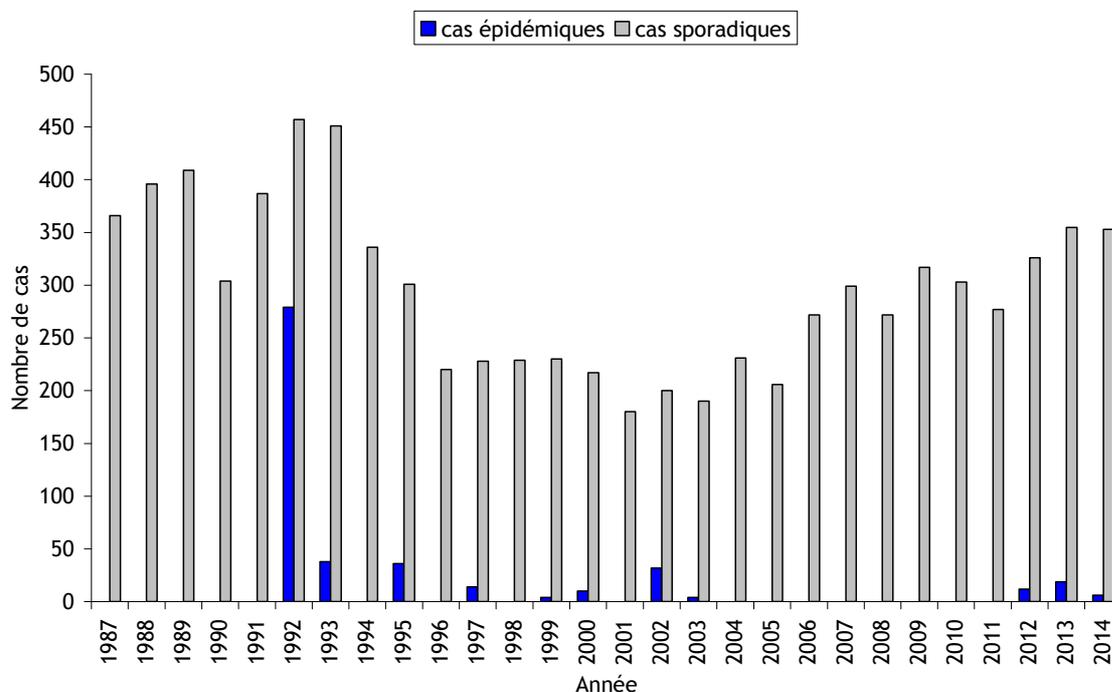
L'incidence de la listériose humaine est de 5,3 cas par million d'habitants en 2014 (5,7 en 2013) (Figure 6). Cette incidence semble se stabiliser autour de 5 cas par million d'habitants, mais n'est pas la plus élevée en Europe.

Figure 6. Incidence de 1999 à 2014 en France



En 2014, une épidémie, un cas groupé possiblement relié à une consommation de Maroilles et aucune toxi-infection alimentaire ont été recensés. L'évolution de la proportion de cas sporadiques et épidémiques est détaillée dans la Figure 7. La dernière épidémie avait été signalée en 2013. L'analyse des dépassements de seuil et des périodes de surveillance renforcée est détaillée dans la suite de ce rapport.

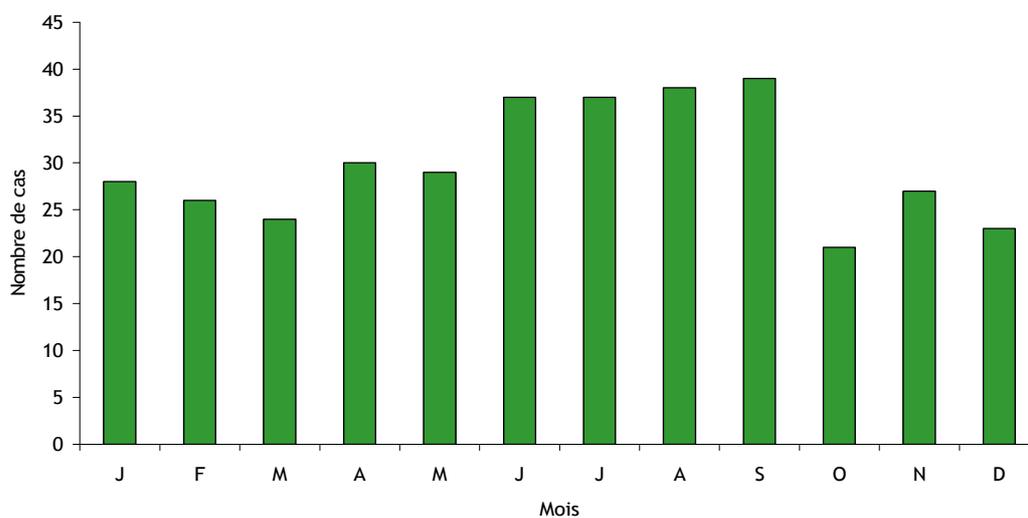
Figure 7. Nombre annuel de cas de listériose en France métropolitaine depuis 1987



Distribution temporelle des cas

La distribution mensuelle et trimestrielle des cas sporadiques pour l'année 2014 est présentée dans les Figures 8 et 9.

Figure 8 : Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2014



Le plus grand nombre de cas a été observé au 3^{ème} trimestre 2014, comme pour les années 2006 à 2011 et 2013, alors qu'il s'agissait du 2^{ème} trimestre en 2012. En 2014, les mois, où l'incidence fut la plus forte, furent Aout, Septembre puis Juin, Juillet. Ceci est aussi observé au niveau Européen. La distribution des cas varie d'une année à l'autre, mais il existe une tendance à l'augmentation des cas durant les mois de Janvier et la période estivale (Mai-Août) (Figure 9). La Figure 10 illustre le fait qu'il ne semble pas exister de corrélation entre le nombre mensuel de souches d'alertes-produits, et le nombre de cas.

Figure 9. Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine de 2007 à 2014

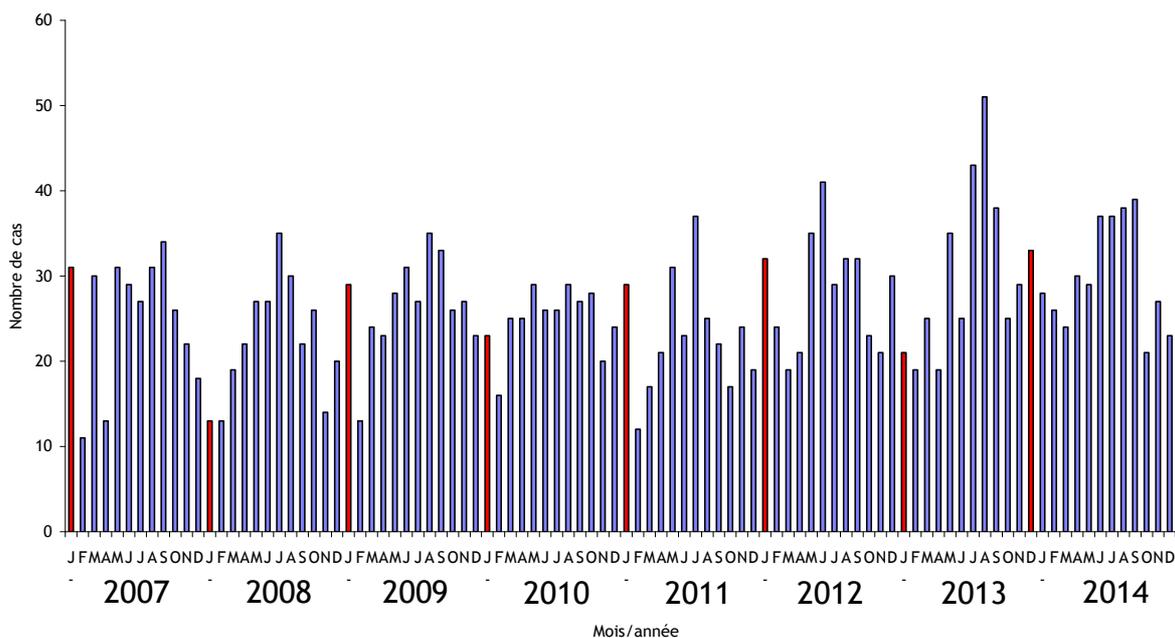
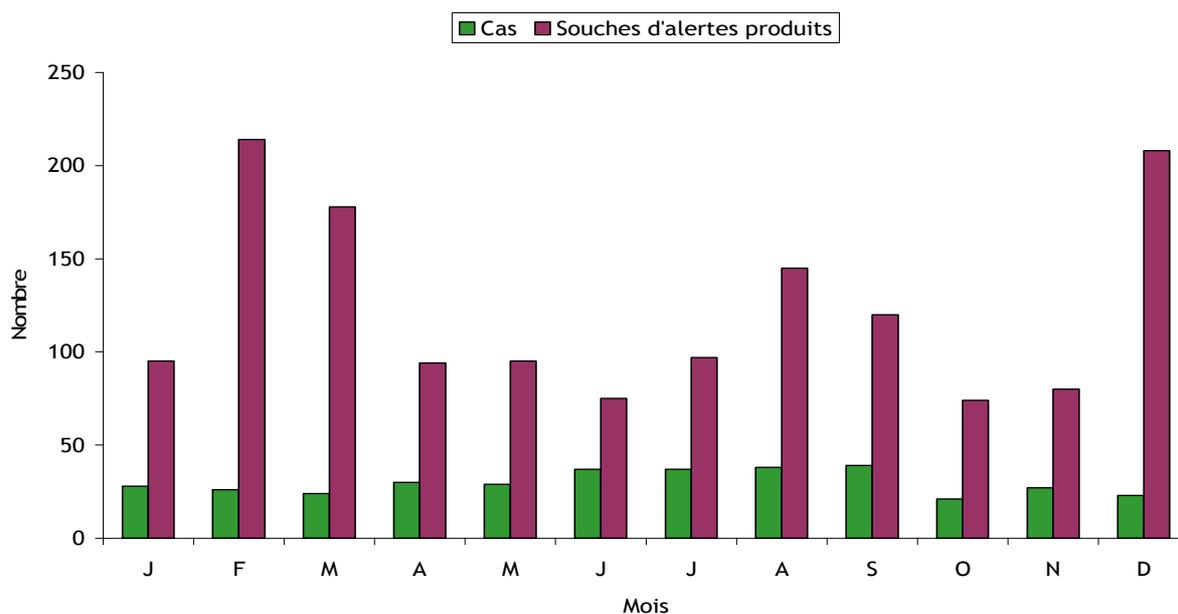


Figure 10. Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose et des souches alimentaires d'alertes produits en France métropolitaine en 2014



Distribution géographique

Par région

La distribution géographique du nombre de cas et les incidences régionales sont présentées dans les Figures 11 et 12 et le Tableau 2. Les chiffres d'incidence sont exprimés en cas par 10^6 habitants et par région et sont calculés à partir des chiffres de population par région évalués par l'INSEE.

- Les régions avec les incidences les plus élevées en 2014 sont : Limousin ($12,1/10^6$), Basse-Normandie ($11,4/10^6$), Franche-Comté ($8,4/10^6$), Alsace ($8/10^6$) et Pays de la Loire ($7,1/10^6$) alors que l'incidence dans ces dernières n'était pas les plus élevées en 2013.

- Les régions avec l'incidence la plus basse en 2014 sont le Poitou-Charentes ($3,3/10^6$) et la Picardie ($3,6/10^6$) qui diffèrent de celles de 2013.

- Les régions avec le plus grand nombre de cas, en valeur absolue, sont comme attendues les plus peuplées et comme en 2013: Ile-de-France (64) et Rhône-Alpes (44). Les régions caractérisées par les plus faibles nombres de cas, en valeur absolue, sont la Corse (2) et la Champagne-Ardenne (5).

Figure 11. Incidences régionales des cas de listériose de 2014
(Incidence / 10^6 habitants / par région)

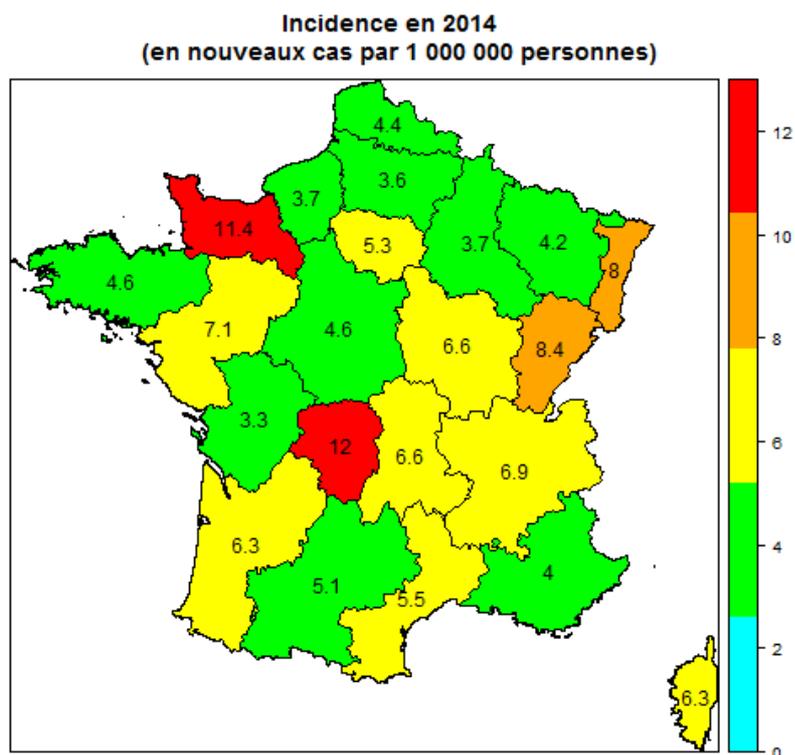


Tableau 2. Distribution régionale des cas sporadiques de listériose diagnostiqués en France métropolitaine depuis 2005

Région	Année									
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
ALSACE	7	8	12	12	7	8	7	9	12	15
AQUITAINE	13	16	32	20	19	20	20	25	13	21
AUVERGNE	1	6	8	5	8	5	10	8	6	9
BASSE-NORMANDIE	6	2	10	5	7	9	7	7	13	17
BOURGOGNE	5	9	7	7	10	10	7	10	8	11
BRETAGNE	13	16	15	14	15	20	19	23	20	15
CENTRE	7	11	8	7	16	13	10	24	17	12
CHAMPAGNE-ARDENNE	3	7	3	7	7	5	12	6	9	5
CORSE	2	4	3	0	0	1	1	3	2	2
FRANCHE-COMTE	4	2	1	1	6	5	8	4	5	10
HAUTE-NORMANDIE	5	7	4	6	10	9	1	6	13	7
ILE-DE-FRANCE	36	42	63	44	58	62	49	52	59	64
LANGUEDOC-ROUSSILLON	7	10	7	14	17	13	9	10	15	16
LIMOUSIN	1	2	6	2	4	6	4	7	2	9
LORRAINE	11	7	2	8	10	10	5	5	5	10
MIDI-PYRENEES	18	25	17	17	12	8	12	17	19	15
NORD-PAS-DE-CALAIS	15	11	21	12	15	17	21	24	29	18
PAYS DE LA LOIRE	9	11	4	11	9	11	14	14	25	26
PICARDIE	3	12	7	6	10	4	4	9	13	7
POITOU-CHARENTES	2	6	8	5	9	6	6	11	6	6
PROVENCE-ALPES-COTE-D'AZUR	16	31	19	18	25	15	23	20	26	20
RHONE-ALPES	18	26	42	47	43	41	28	45	46	44
Total	202	271	299	268	317	298	277	339	363	359

Analyse par forme clinique

Les formes cliniques décrites dans ce chapitre et le Tableau 3 sont celles retenues après concertation avec l'INVS.

Tableau 3. Répartition des formes cliniques de 2006 à 2014

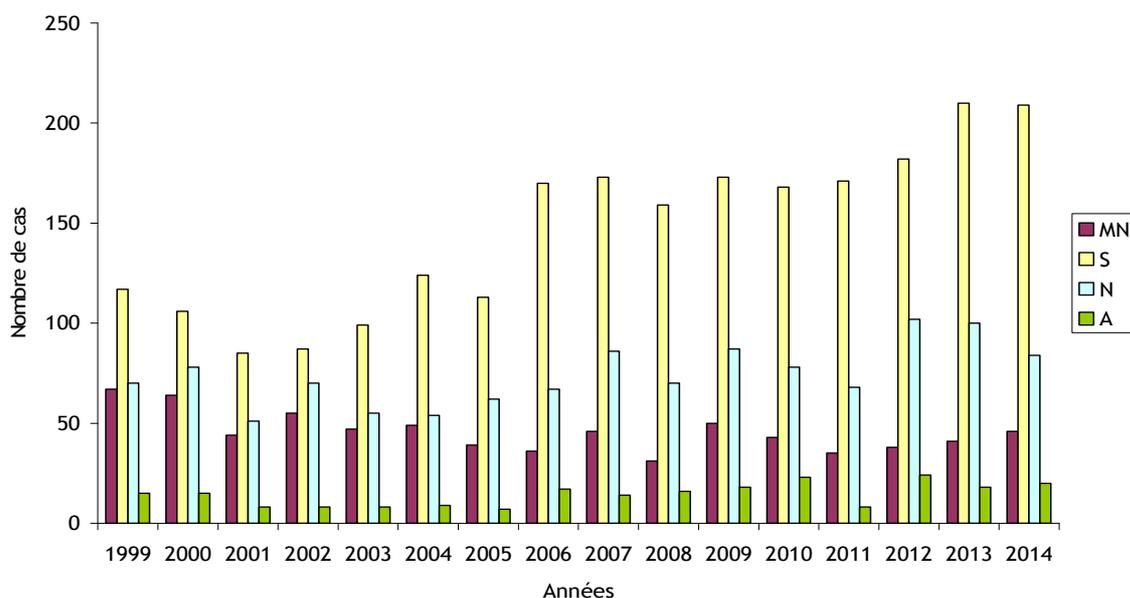
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Total
Formes non materno-néonatales										
Septicémies	170 (71%)	180 (69%)	152 (63%)	170 (62%)	156 (61%)	180 (73%)	169 (56%)	207 (64%)	209 (67%)	1600
Infections neurologiques	54 (22%)	69 (26%)	70 (29%)	85 (31%)	73 (29%)	57 (23%)	104 (35%)	98 (30%)	84 (27%)	688
Autres formes	16 (7%)	12 (5%)	19 (4%)	19 (7%)	26 (10%)	9 (4%)	27 (9%)	18 (6%)	20 (6%)	165
Total	240	261	241	274	255	246	300	323	313	2453
Formes materno-néonatales										
Total	31 (11%)	42 (14%)	27 (10%)	45 (14%)	43 (14%)	31 (11%)	38 (11%)	40 (11%)	46 (13%)	343
Total des formes cliniques	271	303	268	319	298	277	338	363	359	2796

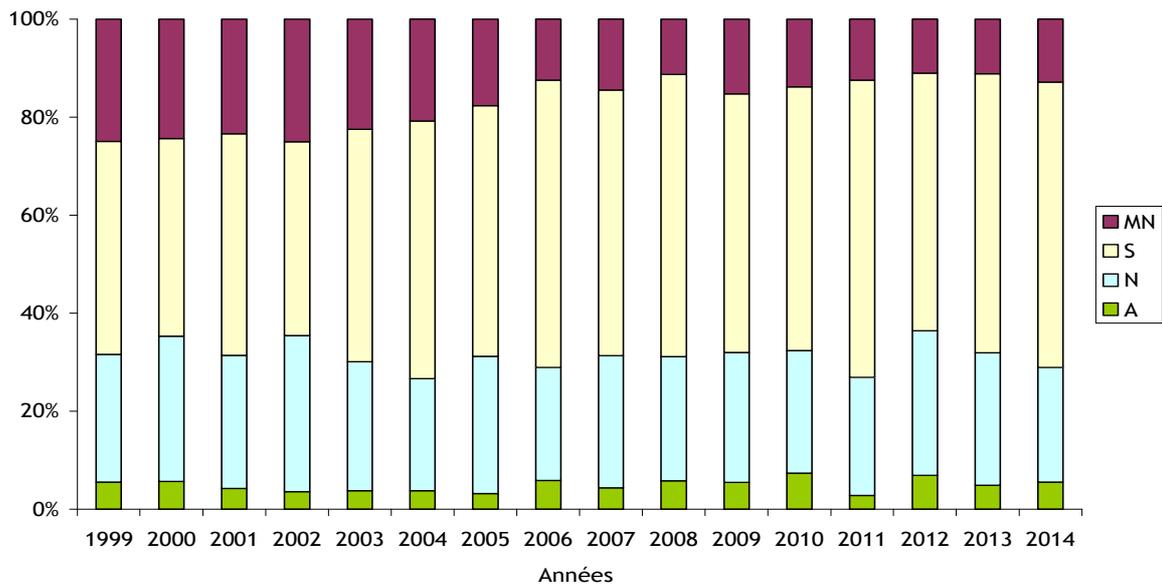
Formes materno-néonatales

En 2014, 46 formes materno-néonatales ont été enregistrées, représentant 13 % du total de cas sporadiques (Figure 13, Tableau 3).

Leur nombre a fortement décliné depuis 1999 (-38%) et est stable depuis 2008 autour de 40 cas annuels, représentant 10 à 15% du total des cas invasifs. Ceci illustre le bénéfice initial et les limites actuelles de la stratégie de prévention fondée sur les recommandations alimentaires.

Figure 13. Nombre de cas et distribution des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine depuis 1999 selon la forme clinique



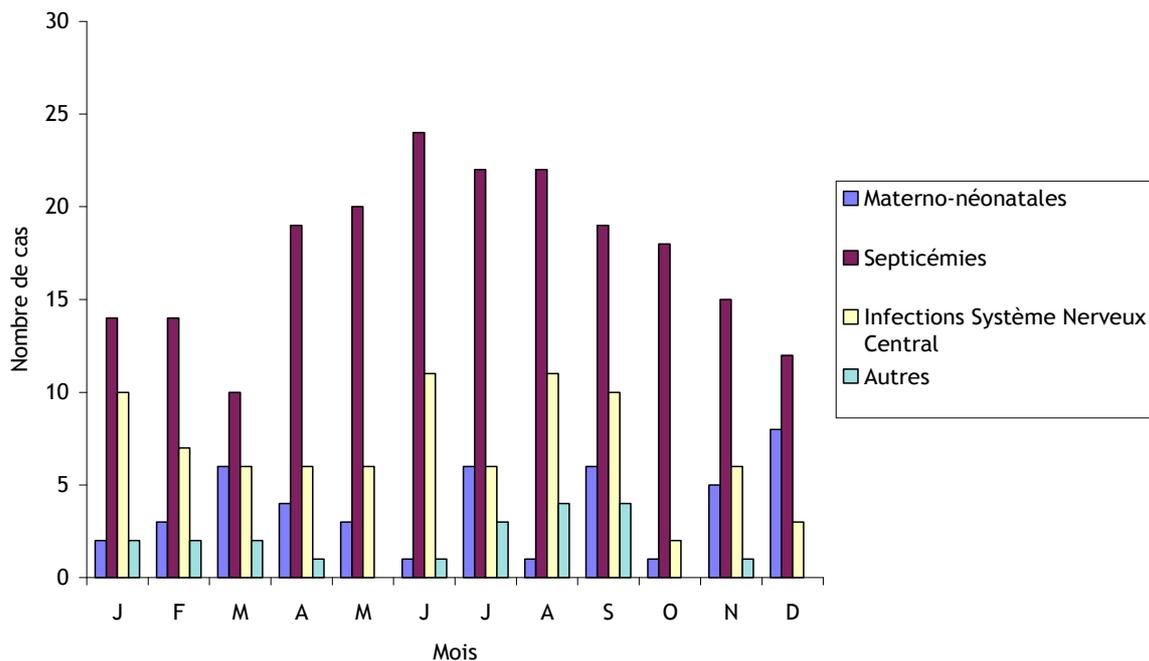


La répartition mensuelle des cas diagnostiqués en 2014 est présentée en Figure 14. La distribution par région des formes materno-néonatales est indiquée dans le Tableau 4. Depuis 1999, les régions Ile de France et Rhône-Alpes rassemblent 50% des cas MN ; alors qu'elles ne concentrent que 32% des naissances et grossesses en France (http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?reg_id=8&ref_id=poptc02201). Ceci pourrait suggérer l'existence d'une exposition particulière à *Lm* dans les populations de ces régions, et justifier des actions ciblées dans la prévention de la listériose.

Formes non materno-néonatales

En 2014, 313 formes non materno-néonatales ont été enregistrées (323 en 2013), soit 87 % du total des cas sporadiques. Le Tableau 3 indique la répartition de ces formes non materno-néonatales.

Figure 14. Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2014 selon la forme clinique



- La proportion et le nombre absolu d'infections du système nerveux central n'ont pas augmenté en 2014 par rapport à 2012-2013, mais reste élevée, après une période de stabilité depuis 2000. On compte environ 84-100 cas/an depuis trois ans, contre 40 à 85 cas/an de 2006 à 2011 (Tableau 3).

Tableau 4. Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France Métropolitaine en 2014 selon la forme clinique

Région	Total	Formes materno-néonatales	Septicémies	Infections du Système Nerveux Central	Autres
ALSACE	15	2	11	1	1
AQUITAINE	21	4	15	2	0
AUVERGNE	9	1	6	1	1
BASSE-NORMANDIE	17	1	15	1	0
BOURGOGNE	11	0	5	5	1
BRETAGNE	15	0	11	2	2
CENTRE	12	0	8	4	0
CHAMPAGNE-ARDENNE	5	1	2	2	0
CORSE	2	0	1	1	0
FRANCHE-COMTE	10	0	7	3	0
HAUTE-NORMANDIE	7	0	5	2	0
ILE-DE-FRANCE	64	20	23	14	7
LANGUEDOC-ROUSSILLON	16	4	6	6	0
LIMOUSIN	9	1	6	1	1
LORRAINE	10	0	5	4	1
MIDI-PYRENEES	15	0	11	3	1
NORD-PAS-DE-CALAIS	18	3	8	6	1
PAYS DE LA LOIRE	26	2	11	12	1
PICARDIE	7	1	3	3	0
POITOU-CHARENTES	6	0	4	2	0
PROVENCE-ALPES-COTE D'AZUR	20	1	16	1	2
RHONE-ALPES	44	5	30	8	1
Total	359	46	209	84	20

- L'augmentation des cas de listériose en 2014 par rapport à 2013 est essentiellement liée à l'augmentation du nombre de cas des formes septicémiques. Celui-ci est voisin de ceux observés entre 1992 et 1995. Ce sont ces formes cliniques qui avaient déjà le plus contribué à l'augmentation du nombre total de cas observés en 2006-2007. Cette augmentation pourrait, comme proposée pour les formes neurologiques, refléter l'augmentation du nombre de personnes à risque de développer une listériose invasive.

- Les formes cliniques « autres » représentent 6 % des cas non materno-néonatales comme en 2013. Le Tableau 5 décrit la répartition de ces infections de 2006 à 2014.

Tableau 5. Répartition des autres formes cliniques de 2006 à 2014

Autres formes	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Total
Vasculaire	1	4	0	1	0	2	1	1	1	11
Adénopathie	1	0	0	0	1	0	1	1	1	5
Endocardite	2	0	0	1	0	0	0	1	2	6
Os/articulaire	4	3	8	7	4	2	5	6	8	47
Digestive	0	1	0	0	1	1	3	1	1	9
Foie	1	0	2	2	1	0	0	0	0	6
Œdème	1	1	2	2	6	0	0	0	0	12
Erysipèle	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Infection d'ascite	5	3	6	3	10	3	12	7	4	53
Infection urinaire	0	0	0	1	1	0	2	0	0	4
Pneumopathie	0	0	1	1	2	1	3	1	3	12
Prostatite	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	16	12	19	19	26	9	27	18	20	147

Les infections ostéoarticulaires et biliaires ont fait l'objet d'analyses spécifiques publiées (9, 10). D'autres travaux sont en cours.

Terrain

Des renseignements cliniques accompagnent la souche. Il s'agit d'informations collectées par le biologiste au moment de l'envoi de la souche qui ne sont pas nécessairement exhaustives. Ces données ne sont renseignées que dans 87 % des cas (stable depuis 2010). Dans 53% des cas renseignés (2013 : 57%), une ou plusieurs pathologies sous-jacentes sont rapportées : cancer, cirrhose, éthylisme, diabète, dialyse, infection par le VIH, transplantation d'organe et traitement immunosuppresseur (25).

Age et sexe des patients avec listériose

L'âge moyen des patients pour les formes non MN est de 71 ans en 2014 (de 1 à 95 ans), contre 70 ans en 2013 (Tableau 6). Cet âge semble se stabiliser autour de 70 ans. La classe d'âge 1-44 ans présentait un risque faible d'infection à Lm et la classe d'âge 15-44 ans est essentiellement associé aux formes NM. 62% (2013 : 57%) des formes non MN concernaient des hommes.

Tableau 6. Age des patients (médiane) de 1999 à 2014 (Modifié de M. Tourdjman, InVS)

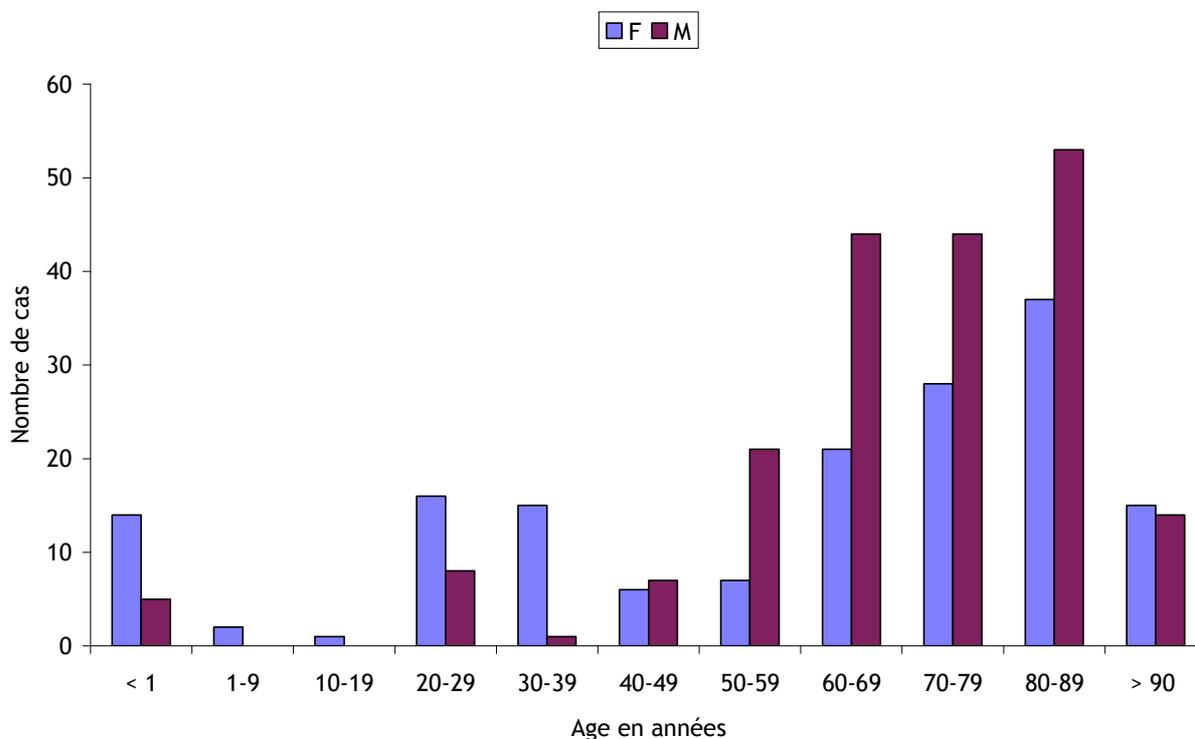
Année	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Age (médiane)	62	62	65	59	64	65	66	68	68	70	67	68	72	71	70	71

La répartition par tranche d'âge des formes non MN est présentée dans le Tableau 7 et la Figure 16. 82% des formes non MN sont survenues après 60 ans (2013 : 83%) et 38 % après 80 ans en 2014 (2013 :33%). Pour les personnes de plus de 60 ans, on note une prédominance masculine.

Tableau 7. Distribution par classe d'âge, sexe et forme clinique des formes non materno-néonatales sporadiques en France métropolitaine en 2014

Sexe	Classe d'âge	Total	Infections du système nerveux central		
			Septicémies	Autres formes	
F	> 28 jours-20 ans	4	2	1	1
	21-60 ans	15	11	4	0
	60-80 ans	49	12	34	3
	> 80 ans	52	11	37	4
M	> 28 jours-20 ans	1	1	0	0
	21-60 ans	37	16	19	2
	60-80 ans	88	20	62	6
	> 80 ans	67	11	52	4
Total (sex ratio)	> 28 jours-20 ans	5 (0,3)	3 (0,5)	1 (0)	1
	21-60 ans	52 (2,5)	27 (1,5)	23 (4,8)	2
	60-80 ans	137 (1,8)	32 (2,7)	96 (1,8)	9
	> 80 ans	119 (1,3)	22 (1)	89 (1,4)	8

Figure 16. Distribution par classe d'âge et par sexe des formes sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2014



Le sexe ratio M/F était de 1,6 en 2014 (2013 :1,4), alors qu'il est de 1 dans la population française âgée de moins de 60 ans. Cette prédominance masculine marquée de la listériose septicémique et neurologique est à ce jour inexpliquée: rôle des comorbidités associées ? Exposition éthylo-tabagique accrue ? Exposition accrue à des aliments contaminés ? Prédilection génétique liée au sexe? Les données de l'étude MONALISA pourraient permettre d'avancer dans la compréhension de cette observation.

D - Analyse microbiologique

Analyses par groupe PCR

Analyse générale

Les résultats obtenus pour les 359 souches d'origine humaine de France métropolitaine sont présentés dans le Tableau 8.

Le CNRL n'a pas identifié de nouveaux profils de groupe PCR pour les souches d'origine humaine. Cependant, 2 cas humains étaient dus à une souche du variant V1 du Groupe PCR IVb comme en 2013 (41).

En 2014, comme depuis 2006, le groupe PCR majoritaire est le IVb, représentant 48% des souches, suivi du IIA puis IIb puis IIc. Le groupe PCR IIc reste stable depuis 2012 et représente 3% des souches. Depuis 2006, il y a équilibre entre la proportion de groupe PCR IVb et non IVb. Cette répartition est différente de celle observée pour les souches alimentaires, où le groupe PCR IIA est majoritaire (Figure 22).

Tableau 8. Répartition des groupes PCR par année depuis 2006

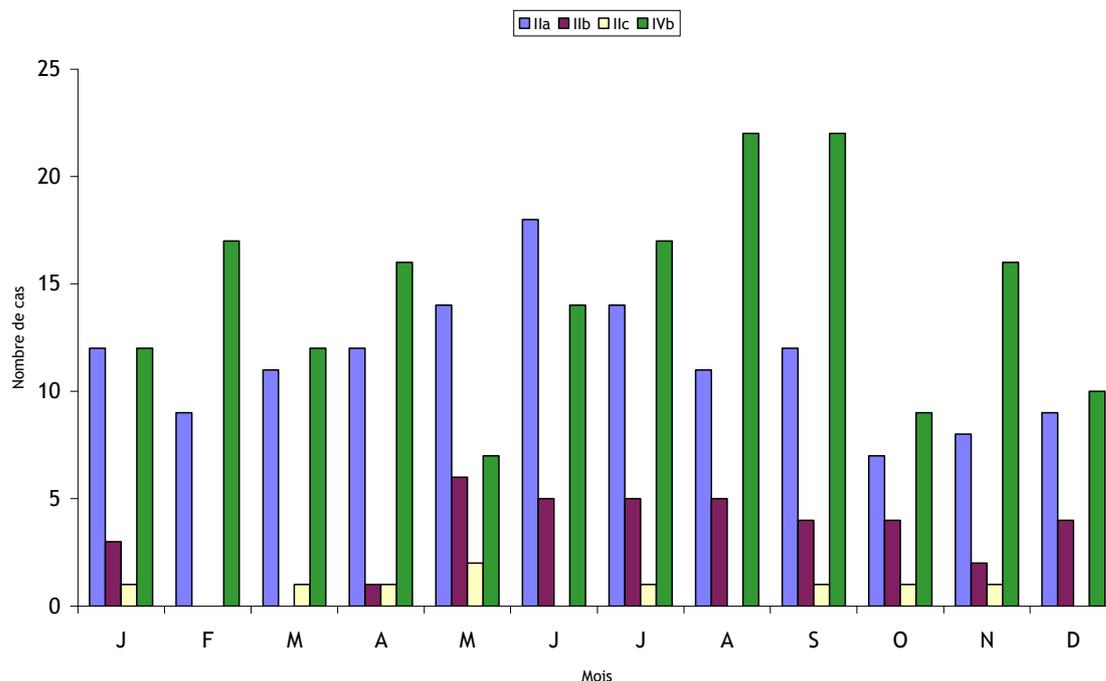
Groupe PCR	Souches du sérovar	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
IIa	1/2a ou 3a	79 (29%)	90 (30%)	89 (33%)	88 (28%)	100 (34%)	85 (31%)	98 (29%)	135 (37%)	137 (38%)
IIb	1/2b, 3b ou 7	47 (17%)	45 (15%)	27 (10%)	47 (14%)	40 (13%)	40 (14%)	43 (13%)	32 (9%)	39 (11%)
IIc	1/2c ou 3c	11 (4%)	14 (5%)	11 (4%)	24 (8%)	5 (2%)	6 (2%)	12 (3%)	12 (3%)	9 (3%)
IVb + IVb-v1*	4b, 4d ou 4e	133+1 (50%)	151+2 (50%)	141 (53%)	159 (50%)	153 (51%)	146 (53%)	185 (55%)	182+2 (51%)	172+2 (48%)
L	4ab ou 4c ou 4a	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total		271	303	268	319	298	277	338	363	359

* variant du Groupe PCR IVb

Distribution temporelle des groupes PCR

La distribution mensuelle des 5 principaux groupes PCR ne semble pas mettre en évidence de saisonnalité pour les groupes PCR considérés (Figure 17).

Figure 17. Distribution mensuelle des souches de *L. monocytogenes* des 4 principaux groupes PCR responsables de cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2014



Distribution régionale des groupes PCR

La distribution régionale des souches par groupe PCR (Tableau 9) ne met pas en évidence de distribution particulière.

Tableau 9. Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2014 selon les groupes PCR

Région	Total	IIa	IIb	IIc	IVb
ALSACE	15	6	2	0	7
AQUITAINE	21	7	4	0	10
AUVERGNE	9	6	1	0	2
BASSE-NORMANDIE	17	4	1	1	11
BOURGOGNE	11	6	0	0	5
BRETAGNE	15	3	4	0	8
CENTRE	12	5	1	0	6
CHAMPAGNE-ARDENNE	5	3	0	0	2
CORSE	2	1	0	0	1
FRANCHE-COMTE	10	6	1	0	3
HAUTE-NORMANDIE	7	3	2	0	2
ILE-DE-FRANCE	64	24	9	0	31
LANGUEDOC-ROUSSILLON	16	8	1	0	7
LIMOUSIN	9	6	1	2	0+1
LORRAINE	10	4	0	1	5
MIDI-PYRENEES	15	3	1	1	10
NORD-PAS-DE-CALAIS	18	6	0	0	12
PAYS DE LA LOIRE	26	4	5	2	15
PICARDIE	7	4	0	0	3
POITOU-CHARENTES	6	2	1	0	3
PROVENCE-ALPES-COTE D'AZUR	20	8	3	0	9
RHONE-ALPES	44	20	2	2	20+1

Total	359	137	39	9	172+2
--------------	-----	-----	----	---	-------

Distribution des groupes PCR selon la forme clinique (Figures 18 et 19)

Comme de 2006 à 2013, les souches du groupe PCR IVb (souches de sérovar 4b, 4d ou 4e) sont majoritaires en 2014, sauf pour les formes septicémiques (Tableaux 10 à 13).

Comme le montrent les figures 18 et 19, les deux groupes PCR majeurs pour les septiciémies sont le IIa et le IVb. Pour les infections du système nerveux central, le groupe PCR majeur est le IVb puis le IIa. Pour les formes materno-néonatales, le groupe PCR majoritaire est le IVb suivi par le IIa qui ne présentent pas en 2014 une proportion proche du IIb comme en 2013. Le groupe PCR IVb-V1 est rencontré dans 2 formes materno-néonatales en 2014. Le groupe PCR IIc est rarement responsable de listériose, et très rarement de forme néonatale ou neurologique, mais, selon les données européennes de 2010-2012 (Communication ECDC), est associé à un fort taux de mortalité.

Tableau 10. Répartition des groupes PCR des souches selon les formes cliniques en 2014

	Materno-néonatale	Septicémie	Infections du système nerveux central	Autres formes	Total
IIa	12	90	27	8	137
IIb	3	24	10	2	39
IIc	0	7	1	1	9
IVb + IVb-v1*	29+2	88	46	9	172+2
L	0	0	0	0	0
Total	46	209	84	20	359

* variant Groupe PCR IVb

Figure 18. Distribution des groupes PCR IIa, IIb, IIc et IVb des souches de *L. monocytogenes* en fonction des formes cliniques en France métropolitaine de 2006 à 2014

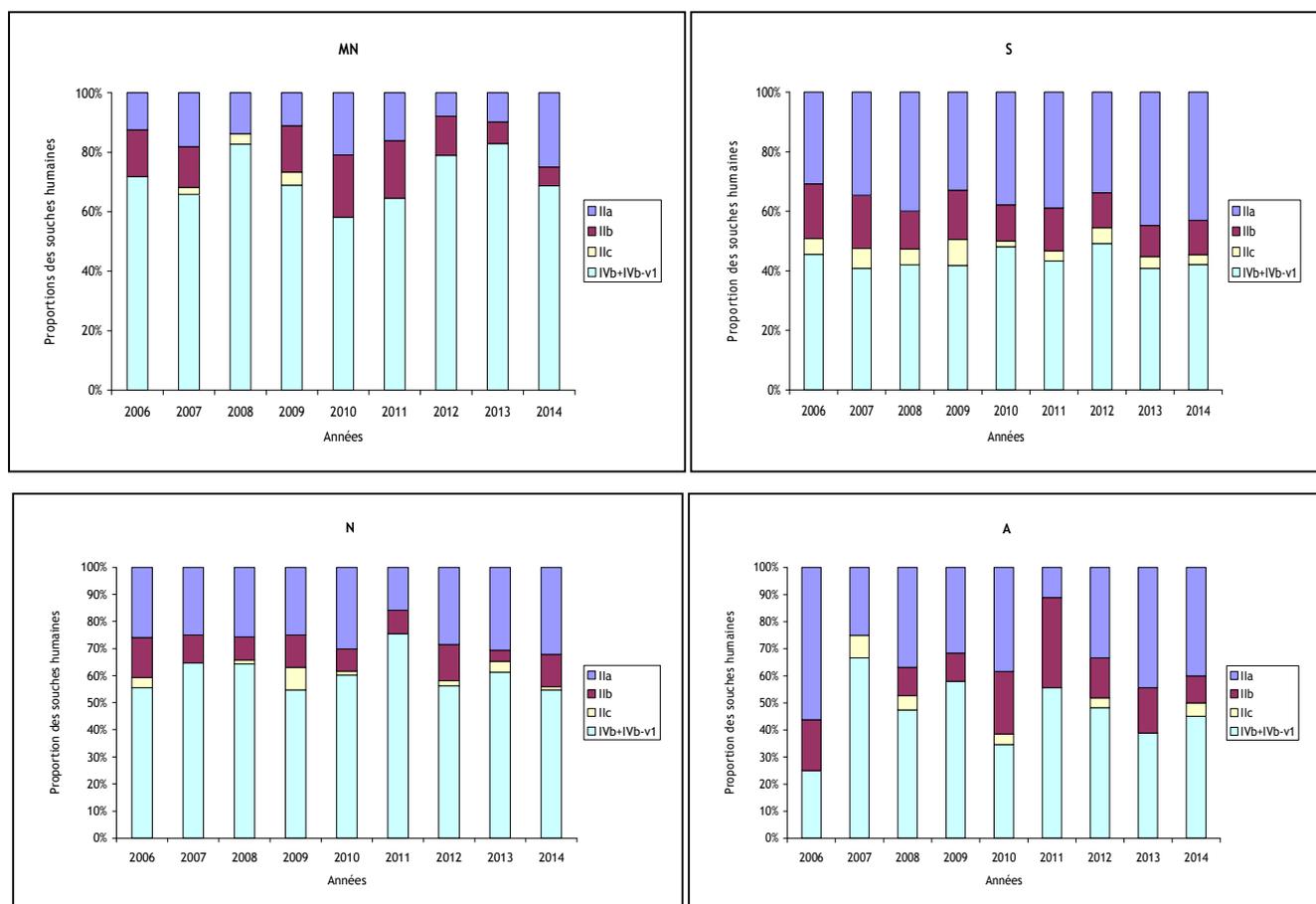
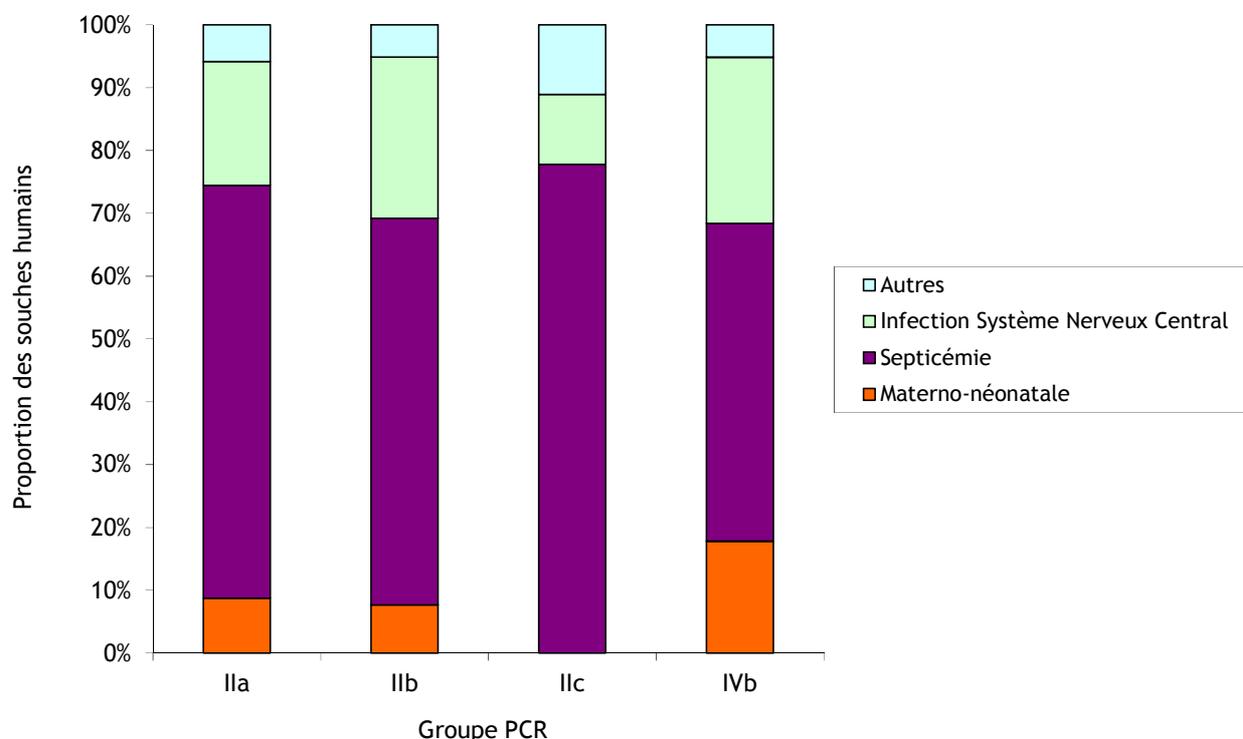


Figure 19. Distribution des groupes PCR des souches de *L. monocytogenes* en fonction des formes cliniques en France métropolitaine en 2014 (Les souches du Groupe PCR IVb comprennent les 2 souches IVb-V1 de formes materno-néonatales).



Aucune corrélation entre l'âge du patient et le groupe PCR n'a été identifiée.

Cas de listériose dans les DROM-TOM-COM

En 2014, 7 cas sporadiques de listériose (6 formes bactériémiques et 2 formes materno-néonatales) ont été notifiés pour des patients résidant à la Réunion, 1 cas à Mayotte (une forme materno-néonatale) et 1 cas en Guyane française (une forme materno-néonatale).

Le plus grand nombre de cas sporadiques de listériose des DROM-TOM-COM se situe, comme en 2013 à la Réunion. 2 enquêtes demandées par la CIRE ainsi que l'ARS de la Réunion ont été réalisées par le CNRL en 2014, mais aucune souche d'alertes produits n'est communiquée par ce DROM.

Etude de la résistance aux antibiotiques

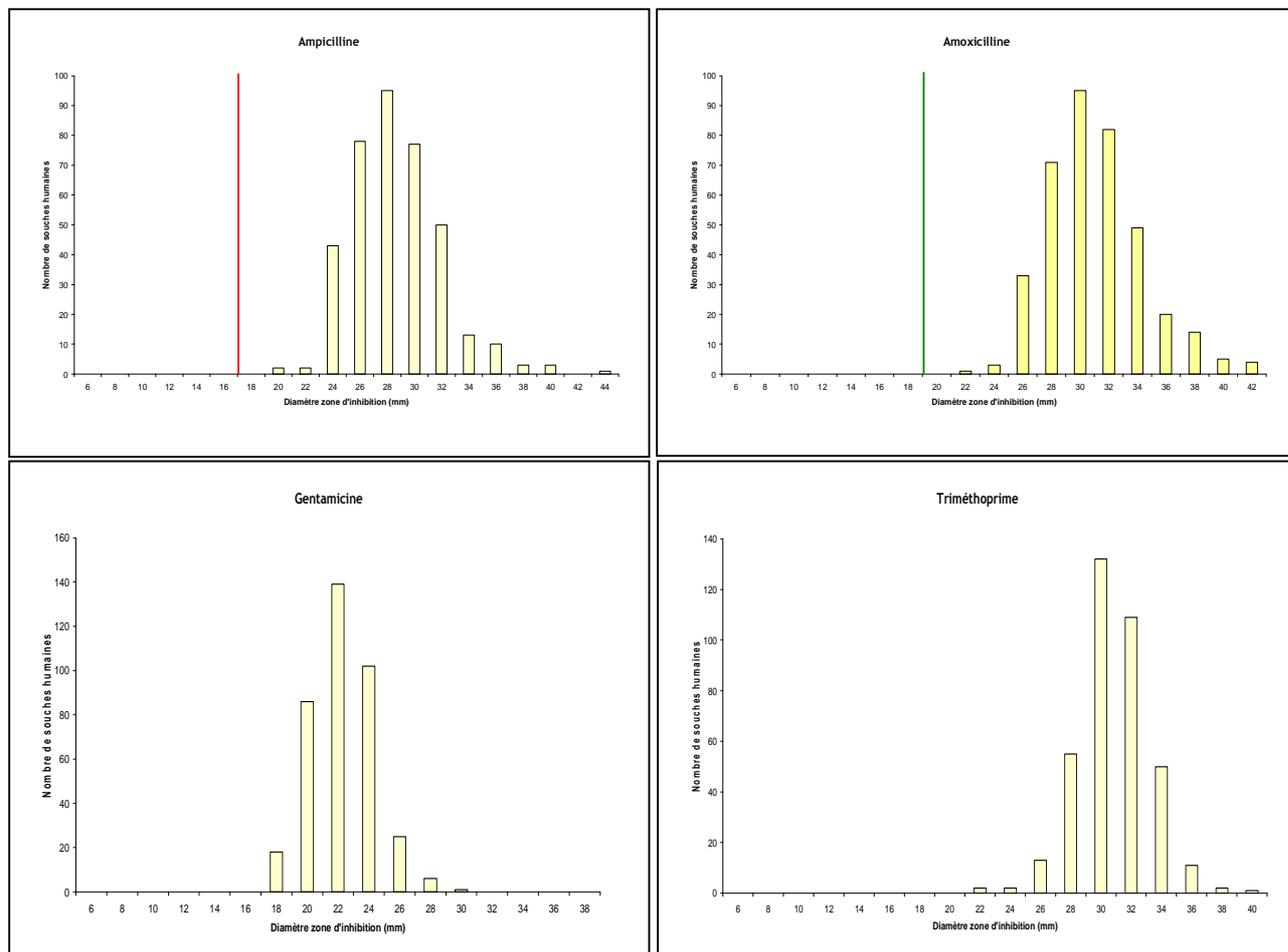
Toutes les souches présentaient, comme en 2013, une résistance naturelle *in vitro* à la céfotaxime, la clindamycine, aux sulfonamides, à la fosfomycine et l'acide nalidixique.

Toutes les souches étaient en 2014 sensibles à la pénicilline, à l'ampicilline, à l'amoxicilline, à la rifampicine, à l'imipénème, au triméthoprim, à la gentamicine, à la kanamycine, et à la streptomycine. Comme en 2013, aucune souche humaine n'était limite en sensibilité pour l'amoxicilline et l'ampicilline (Figure 20) (44).

Toutes les souches étaient très majoritairement sensibles à l'érythromycine, à la ciprofloxacine, à la tétracycline, à l'acide fucidique, à la moxifloxacine, à la levofloxacine, à la vancomycine, et au chloramphénicol. Cependant, il a été constaté 11 souches résistantes à l'érythromycine, 1 souche résistante à la ciprofloxacine, et 7 souches résistantes à la tétracycline, dont 4 contacts.

Les souches avec des résistances atypiques non décrites seront étudiées en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques.

Figure 20. Distribution des diamètres des zones d'inhibition pour l'ampicilline, l'amoxicilline, la gentamicine et le triméthoprim en 2014 (Légende : le trait rouge indique la valeur de référence EUCAST définissant la résistance ; le trait vert signale la valeur de référence CLSI; il n'existe pas de valeur de référence avec la concentration des disques utilisés au CNR pour le triméthoprim ni pour la gentamicine).



Des souches d'origine non clinique dans la littérature résistantes à l'ampicilline ou à la gentamicine ont été décrites (38). Cependant ces données n'ont pas été confirmées par d'autres investigateurs. Ces souches ont été demandées aux investigateurs qui les ont décrites, mais nous ne les avons pas reçues à ce jour. Dans le cadre de la surveillance microbiologique française, aucune observation similaire n'a été faite en France parmi les souches cliniques. Les conséquences de l'émergence d'une telle résistance seraient majeures dans la mesure où l'amoxicilline est l'antibiotique de référence pour le traitement de la listériose recommandé en première intention (8, 35).

La résistance à la rifampicine décrite en 2013 par le CNRL n'a pas été observée sur les souches humaines en 2014 (11).

Typage moléculaire des souches par macrorestriction d'ADN

La méthode est détaillée dans l'annexe C.

Analyse des profils de macrorestriction d'ADN présents dans les dépassements de seuil

Trente pulsotypes combinés *Ascl/Apal* ont occasionné au moins 3 cas humains en France en 2014 (Tableau 11), dont 17 appartiennent aux 25 pulsotypes ayant occasionné des dépassements de seuil depuis 2006 (année de changement de la définition du dépassement de seuil) (Tableau 12).

Depuis 2006, les profils majoritaires des infections humaines étaient reliés au groupe PCR IVb alors que depuis 2013, ils sont reliés en proportion égale aux groupes PCR IIa et IVb ce qui est à surveiller.

Analyse des profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines

Le Tableau 11 présente les fréquences des pulsotypes des souches humaines en 2014.

Quelle que soit la forme, le profil M-IVb-210792-210792 du groupe IVb est majoritaire comme en 2013. La diversité des profils est plus importante dans les infections septicémiques que dans les autres formes (N, MN et A).

Tableau 11. Classement par ordre de fréquence des pulsotypes des souches humaines de 2014 (fréquence ≥ 3 souches humaines). Les lignes correspondant aux profils endémiques sont grisées.

Profils de macrorestriction (Espèce-Groupe PCR- Pulsovar <i>Ascl-Apal</i>)	Total souches humaines	Total souches par formes cliniques*				Présence dans un dépassement de seuil
		S	N	A	MN	
M-IVb-210792-210792	32	17	11	1	3	L06/02, L07/07, L08/03, L08/07, L09/06, L10/04, L10/09, L10/11, L11/05, L11/08, L12/02, L12/13, L13/03, L13/08, L14/16
M-IVb-200792-200792	28	16	6	2	4	L06/07, L07/01, L07/03, L07/05, L07/10, L07/14, L08/01, L08/05, L08/09, L09/01, L10/07, L10/08, L11/03, L12/05
M-IVb-151005-151005	24	13	5	2	4	L06/04, L07/04, L08/06, L09/09, L10/05, L10/12, L11/07, L11/09, L12/07
M-IVb-011001-160602	20	9	6	1	4	L06/11, L07/13, L08/02, L09/02, L09/05, L09/10, L11/06, L12/08, L13/02, L13/06, L14/02, L14/09, L14/13, L14/17
M-IVb-270801-050506	16	7	5	0	4	L06/05, L06/09, L07/02, L07/11, L07/16, L10/06, L11/04, L12/04, L12/10, L14/04
M-IIa-010901-020701	12	8	3	0	1	L06/03, L06/10, L07/08, L07/12, L09/11, L13/01, L13/05, L13/10, L14/01, L14/15
M-IIa-210408-150807bis**	12	6	3	0	3	L14/05, L14/06
M-IIa-241006-090209bis**	10	6	2	0	2	L14/03, L14/10
M-IIb-310801-061006**	9	6	2	1	0	
M-IVb-151005-111206	9	5	4	0	0	L14/14
M-IIa-050207-050207	7	6	0	1	0	L12/11, L13/11, L14/08
M-IIb-010107-010107**	7	1	3	1	2	L14/11
M-IIc-301006-301006	6	4	1	1	0	L09/08, L10/02
M-IIa-080507-020507**	5	4	1	0	0	
M-IIb-231006-310801	5	3	1	0	1	L14/07
M-IVb-071207-071207	5	3	1	1	0	L13/09
M-IVb-151005-041004**	5	2	0	0	3	
M-IIa-130607-150408**	4	4	0	0	0	
M-IIa-200807-090408**	4	2	2	0	0	
M-IIa-241006-150408	4	2	2	0	0	
M-IIa-241006-241006	4	3	0	0	1	L09/03, L12/12, L13/04
M-IIb-310801-310801	4	3	1	0	0	L11/01, L12/09, L14/12
M-IVb-151005-220607	4	1	1	1	1	
M-IIa-020707-020707**	3	1	2	0	0	
M-IIa-100608-230905**	3	3	0	0	0	
M-IIa-120808-100613**	3	3	0	0	0	
M-IIa-200212-131107**	3	2	0	1	0	
M-IIa-271006-050207**	3	2	0	0	1	
M-IIa-271106-271106**	3	2	1	0	0	L06/08
M-IIb-050307-310801**	3	2	1	0	0	

*S : septicémie ; N : infection du système nerveux central ; A : Autres ; MN : materno-néonatales

** : Nouveau profil avec fréquence ≥ 3 cas humains par rapport à 2013

Les principaux profils dans les infections humaines sont les profils endémiques retenus pour la surveillance microbiologique nationale.

Les pulsotypes identifiés dans les infections humaines constituent un sous-ensemble des souches d'origine alimentaire ou environnementale.

Une décroissance du nombre de nouveaux profils est observable (Tableau 13), elle reflète la représentativité croissante de la base de données de pulsotypes du CNRL.

Tableau 12. Distribution par profils Ascl et Apal et groupe PCR des dépassements de seuil de 2006 à 2014

Profils Ascl/Apal	Groupe PCR	Nombre de dépassements de seuil par année									Dépassements de seuil (N)
		2006**	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
210792/210792	IVb	1	2	2	1	3	2	2	2	1	16
011001/160602	IVb	1	1	1	3	0	1	1	2	4	14
200792/200792*	IVb	1	4	3	1	2	1	1	0	0	13
151005/151005	IVb	1	1	1	2	2	2	1	0	0	10
270801/050506	IVb	2	3	0	0	1	1	2	0	1	10
010901/020701	IIa	2	2	0	1	0	0	0	3	2	10
151005/111206	IVb	0	0	1	1	2	0	1	0	1	4
241006/241006	IIa	0	0	0	1	0	0	1	1	0	3
180110/190110	IVb	0	0	0	0	1	0	2	0	0	3
050207/050207	IIa	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3
310801/310801	IIb	0	0	0	0	0	1	1	0	1	3
220803/200792	IVb	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
210408/210408**	IIa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
241006-090209bis***	IIa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
301006/301006	IIc	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
271106/271106	IIa	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
020511/020511	IVb	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
230908/180110bis	IIa	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
090507/180407	IIb	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
210792/201104	IVb	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
160907/160907	IVb	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
200792/170407	IVb	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
071207/071207	IVb	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
141107/200792	IVb	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
010107/010107bis***	IIb	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
231006-310801***	IIb	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total		11	16	9	11	13	9	13	11	17	110

* le numéro de nomenclature correspond à la date de la première apparition de ce profil lors de la surveillance hebdomadaire (ex : 200792 = profil du 20 Juillet 1992) ; **année du changement de la définition du dépassement de seuil ; ***nouveaux profils

Tableau 13. Fréquence et nombre de pulsotypes Ascl/Apal de 2008 à 2014 en France métropolitaine

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Pulsotype déjà connu identifié 1 fois	96	96	84	94	65	101	78
Pulsotype identifié 2 à 5 fois	26	24	33	31	22	39	28
Pulsotype identifié 6 à 12 fois	7	5	3	4	13	9	8
Pulsotype identifié > 12 fois	2	6	5	4	5	4	5
Nouveaux pulsotypes identifiés*	57	44	28	25	25	16	8
Total des pulsotypes Ascl/Apal	268	319	298	277	338	363	359

* nouveau pulsotype Ascl et/ou Apal

Emergence de profils endémiques (n>12 cas/an)

L'analyse des profils des souches humaines depuis 2006 identifie les trois profils endémiques (n>12 cas/an) reconnus dans la surveillance nationale depuis 2012: M-IVb-210792-210792, M-IVb-200792-200792 et M-IVb-151005-151005. Deux profils pourraient être candidats à être classés parmi les profils endémiques (M-IVb-011001-160602 et M-IVb-270801-050506) bien qu'ils n'aient pas atteint le seuil nécessaire des 12 cas pour certaines années (Tableau 14). La proposition de leurs inclusions dans les profils endémiques sera présentée lors de la prochaine réunion de cellule *Listeria*.

Tableau 14. Distribution par année des profils endémiques et profils candidats (*) pour les souches humaines de 2006 à 2014 (NB : les profils similaires et identiques sont présentés ensemble)

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
M-IVb-270801-050506*	17	17	11	12	19	13	17	9	16
M-IVb-011001-160602*	9	16	12	18	10	15	11	18	20
M-IVb-151005-151005	20	18	10	16	22	20	21	18	24
M-IVb-200792-200792	25	20	18	24	14	18	22	24	28
M-IVb-210792-210792	19	23	25	22	26	23	29	47	32

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

Analyse générale

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

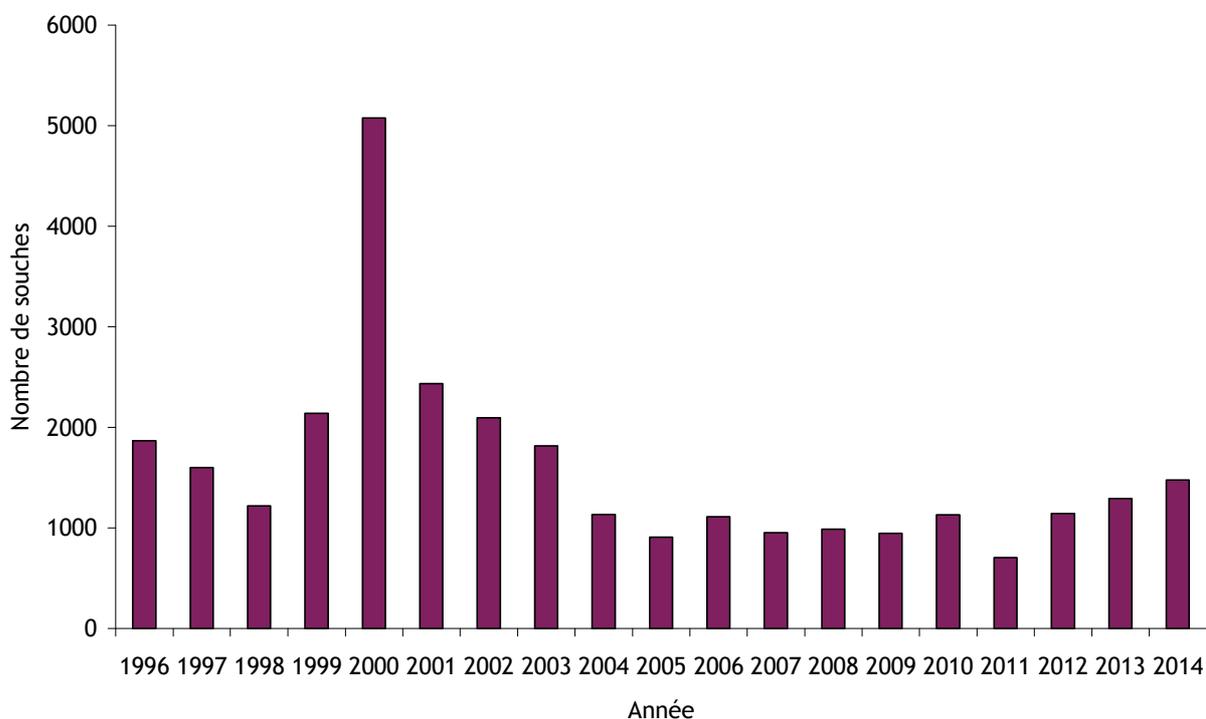
- participer à l'identification du véhicule alimentaire en cas de dépassement de seuil ou en début d'épidémie ou de cas groupés,
- comparer les souches cliniques aux souches alimentaires et identifier leurs caractéristiques respectives,
- constituer une banque de données pour mener les investigations en cas de dépassement de seuil ou en début d'épidémie.

En 2014, 1475 souches d'origine non humaine ont été adressées au CNRL par des laboratoires français soit une augmentation de 13% par rapport à 2013, semblable à celle constatée en 2013 par rapport à 2012 (Figure 21). L'envoi des souches d'autocontrôles alimentaires est volontaire, et le nombre de souches hors autocontrôles ne représente qu'une faible partie (non estimée) des souches isolées des laboratoires d'analyses agro-alimentaires en France.

98% (2013: 95%) des souches correspondaient à l'espèce *L. monocytogenes*, seule espèce mentionnée dans les réglementations de sécurité sanitaire des aliments et de l'environnement comme critère microbiologique de sécurité. En raison du développement du critère *Listeria* spp. retenu pour la maîtrise de l'environnement des ateliers de production, des laboratoires envoient les autres espèces pour confirmation à la demande de leurs clients (6).

22% des souches reçues étaient contaminées et nécessitaient un réisolement (non-respect de l'étape de purification imposée pour la microbiologie alimentaire dans les normes EN ISO 11290), allongeant le délai d'analyse et pouvant entraîner un retard en cas d'investigation autour d'un cas humain ou d'un cas groupé.

Figure 21. Nombre annuel de souches d'origine non humaine adressées par des laboratoires français depuis 1996



La répartition des souches de 2014 suivant la catégorie de laboratoires était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 314 souches (21%) [2013 : 468]
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 1119 souches (76%) [2013 : 780]
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 31 souches (2%) [2013 :13]
- Laboratoires ANSES - LNRI : 5 souches (<1%) [2013 : 13]
- Laboratoires d'Hygiène de Centres Hospitaliers : 2 souches (<1%) [2013 : 17]
- Laboratoires de recherche : 4 souches (<1%) [2013 : 1]

L'origine des souches était la suivante :

- Souches isolées d'aliments : 1271 souches (86%) [2013 :1034]
- Souches isolées de l'environnement : 175 souches (12%) [2013 :246]
- Souches de recherche/sans information : 25 souches (1%) [2013 :12]
- Souches isolées chez l'animal : 4 souches (<1%) [2013 :0]

Les proportions respectives des origines des souches sont stables depuis 2006. Une fraction des souches alimentaires et de l'environnement, 4% (2013 : 9%), sont réceptionnées de laboratoires d'analyses privés pour caractérisation et isolées dans le cadre d'autocontrôles. Cette expertise est alors facturée au laboratoire demandeur, mais conformément à l'application de l'article R201-11 du Code Rural et de la Pêche Maritime, en cas de problème de santé publique pouvant être relié à ces souches, le CNRL, après information de son client, communiquera les informations aux autorités compétentes et intégrera ces souches dans la surveillance nationale.

Souches isolées d'aliments

Catégories de laboratoire ayant adressé les souches

La provenance des 1271 souches isolées d'aliments en 2014 (2013: 1034 souches) selon la catégorie de laboratoires, était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD): 283 (22%) [2013 : 340]
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire: 950 (75%) [2013 : 653]
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes: 31 (2%) [2013 : 13]
- Laboratoires ANSES-LNRL : 5 (<1%) [2013 : 13]
- Laboratoires d'hygiène de Centres Hospitaliers : 2 (<1%) [2013 : 15]

En 2014, le nombre de souches isolées d'aliments reçues au CNRL a augmenté de 24% par rapport à 2013. La répartition entre les différentes catégories de laboratoires envoyant des souches au CNRL est équivalente à celle de 2013, sauf les envois des laboratoires interrégionaux DGCCRF et des laboratoires privés d'hygiène alimentaire qui sont en augmentation. Aucune souche provenant d'échantillons de plan de surveillance ou de contrôle dépassant les seuils réglementaires de 2014 n'a été constatée et donc communiquée au CNRL par le LNRL.

Nombre de souches et distribution par espèce

930 (98%) (98% en 2013) des 950 souches ont été identifiées comme *Lm* ce qui est stable. Les analyses sur 321 souches (2013 : 17) n'ont pas été effectuées, car il ne s'agissait pas de souches de *Listeria* ou la souche était non viable dans 9 cas et, dans 312 cas, il s'agissait de collections de souches isolées d'opérateurs agro-alimentaires que les autorités compétentes ont fait remonter au CNRL, mais dont la caractérisation n'a pas été sollicitée par la suite dans les investigations (ex : 5 colonies par aliment et analyse d'une seule colonie).

En 2014 comme en 2013, les souches non *Listeria* étaient principalement des souches de *Bacillus circulans* qui présentaient des colonies caractéristiques de *Listeria* spp. sur le milieu Agar selon Ottaviani et Agosti (1). Ces souches non *Listeria* sont maintenant identifiées au CNRL par Maldi-Tof (Brucker).

La répartition par espèce des 930 souches de *Listeria* était la suivante :

- *L. monocytogenes* : 930 souches (98%) [2013 : 998]
- *L. innocua* : 16 souches (2%) [2013 : 8]
- *L. welshimeri* : 3 souches (<1%) ([2013 : 10]
- *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* : 1 souches (<1%) [2013 : 1]

98% (98% en 2013) des souches envoyées sont correctement identifiées, ce qui découle possiblement en partie de l'efficacité des géloses chromogènes pour l'isolement de *Lm*.

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

L'origine des 930 souches de *L. monocytogenes* selon la catégorie d'aliment, était la suivante:

- Viande et produits carnés : 281 souches (30%) [2013 : 367]
- Lait et produits laitiers : 412 souches (44%) [2013 : 393]
- Produits de la pêche : 121 souches (13%) [2013 : 67]
- Végétaux : 3 souches (<1%) [2013 : 5]
- Autres aliments : 102 souches (11%) [2013 : 163]
- Sans information (confidentiel) : 11 souches (1%) [2013 : 3]

Les autres aliments sont principalement des plats cuisinés et pâtisseries. Les origines non précisées sont des demandes de laboratoires privés dont les analyses ont été facturées et qui n'ont pas souhaité transmettre d'information.

En 2014, la distribution des souches est proche de celles de 2013, avec une diminution de la proportion des souches isolées de viandes et produits carnés ainsi que des autres aliments compensée par une augmentation des souches isolées de produits laitiers.

Distribution des souches alimentaires de *Lm* par groupe PCR

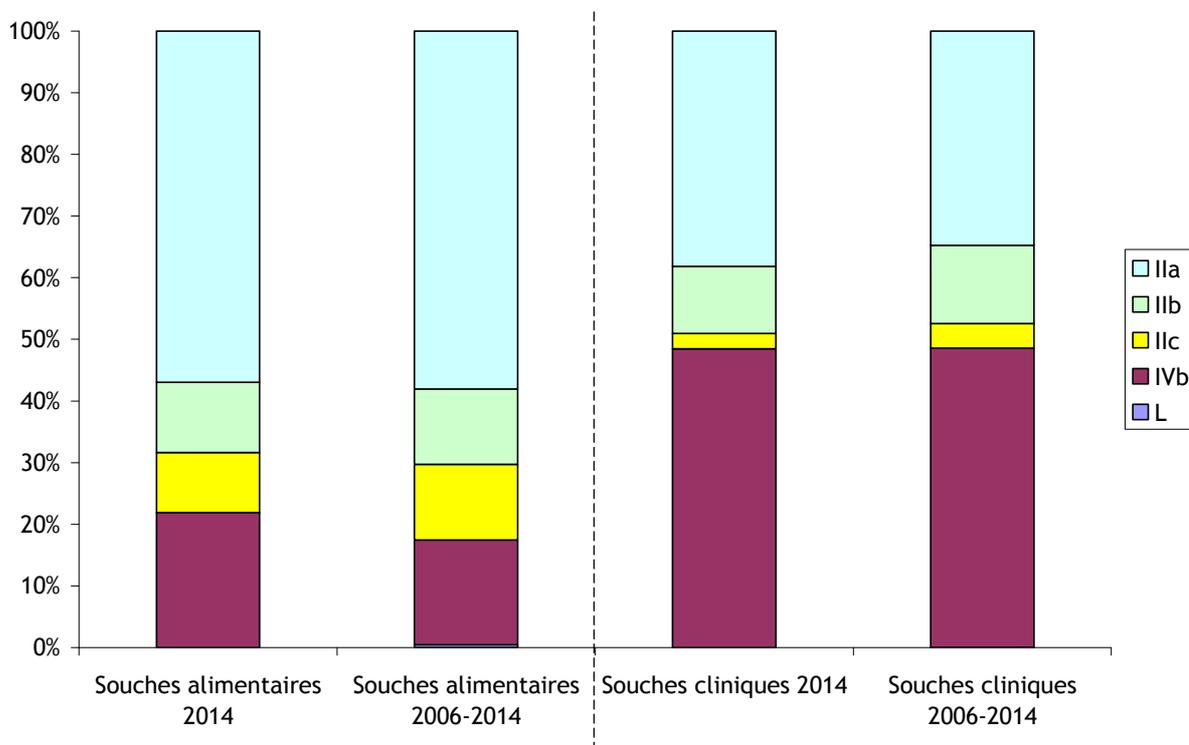
La répartition des souches par groupe PCR et par catégorie d'aliments est présentée dans le Tableau 15. Le groupe majoritaire est le groupe PCR IIa (sérovars 1/2a, 3a) comme depuis 2006 (autour de 60%), il représente 57% des souches en 2014 contre 70% en 2013. Il faut cependant noter une diminution du Groupe PCR IIa (-24% de 2013 à 2014) majoritaire pour les souches alimentaires et une augmentation du Groupe PCR IVb (+32% de 2013 à 2014). Aucune souche du Groupe PCR L n'a été isolée en 2014.

Tableau 15. Distribution par groupe PCR par catégorie d'aliments des 930 souches de *L. monocytogenes* reçues en 2014 de laboratoires français comparée à la distribution par groupe PCR des souches humaines françaises

Groupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total	Souches humaines
IIa	180	187	105	1	53	4	530 (57%)	137 (38%)
IIb	8	83	4	1	7	3	106 (11%)	39 (11%)
IIc	57	13	9	1	10	0	90 (10%)	9 (3%)
IVb	36	129	3	0	32	4	204 (22%)	172+2 (48%)
L	0	0	0	0	0	0	0 (0%)	0 (0%)
Total	281	412	121	3	102	11	930	359

Comme l'illustrent la Figure 22 et le Tableau 15, le groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) ne représente que 22% des souches isolées d'aliments, alors qu'il est le groupe le plus fréquemment impliqué en pathologie humaine, ce qui suggère une virulence accrue des souches du groupe PCR IVb (13, 18, 37, 42, 43). Le groupe IIc semble être associé à la viande et autres produits carnés, et il n'est que rarement à l'origine de cas humains. Les souches du groupe PCR IVb expriment une InlA fonctionnelle (facteur de virulence permettant la traversée des barrières intestinale et placentaire) (18, 37, 43), alors que les souches du groupe PCR IIc expriment une InlA très majoritairement tronquée et non fonctionnelle. Ceci peut, en partie, expliquer leurs fréquences différentes dans les souches d'origine alimentaires vs. cliniques (37).

Figure 22. Distribution des groupes PCR des souches de *L. monocytogenes* cliniques et alimentaires en 2014 et de 2006 à 2014



Distribution des souches alimentaires de *Lm* par pulsotype

Comme présenté dans le Tableau 16, la comparaison entre les souches d'origine alimentaire et clinique illustre que :

- Certains des principaux profils ($n > 5$ souches alimentaires avec ce profil dans l'année) dans les souches alimentaires ne sont pas retrouvés dans les principaux profils des souches cliniques ($n > 3$ cas humains avec ce profil dans l'année): il pourrait s'agir de souches relativement moins virulentes, mais également des candidats aux dépassements de seuil futurs à surveiller. A l'inverse, l'un des principaux profils des souches cliniques (M-IVb-210792-210792) n'est pas un profil principal dans les souches alimentaires.

- Certains des principaux profils de souches alimentaires sont aussi des principaux profils de souches cliniques, certains impliqués dans des dépassements de seuil.

Les profils M-IIc-301006-301006, représentant 77% des souches du Groupe PCR IIc entre 2006-2014, et les profils M-IIa-241006-241006 ainsi que M-IIa-230905-230905 sont prédominants en alimentaire et dans les échantillons d'environnement (décrits ci-après) alors qu'il n'existe presque pas de cas humains (< 6) en 2014 avec ces profils.

Tableau 16 Pulsotypes les plus fréquemment rencontrés (>5) en 2014 pour les souches alimentaires. Les profils endémiques des souches humaines sont grisés

Profils de macrorestriction (Espèce-Groupe PCR- Pulsovar Ascl-Apal)	Nombre de souches alimentaires	Présence dans les profils des souches cliniques majoritaires (>3)	Nombre de dépassements de seuil 2014 avec ce profil
M-IIa-241006-241006	87	X	
M-IIa-230905-230905	68		
M-IIc-301006-301006	53	X	
M-IVb-151005-151005	43	X	
M-IVb-200792-200792	38	X	
M-IIa-010901-020701	35	X	2
M-IIb-010107-010107	34	X	1
M-IIb-160807-150708	33		
M-IVb-140907-070907	23		
M-IIa-160807-061007	22		
M-IIa-230905-100214	20		
M-IVb-210792-210792	19	X	1
M-IIa-271006-050207	17		
M-IIa-070408-061007	16		
M-IIa-270707-270707	16		
M-IIa-050207-050207bis	13	X	1
M-IIa-190410-010607bis	12		
M-IIa-271106-271106	12		
M-IVb-011001-160602	12	X	4
M-IIa-241006-230905	10		
M-IIb-310801-310801	10	X	1
M-IIa-241006-090209bis	8	X	2
M-IVb-270801-050506	8	X	1
M-IIa-080507-020507	7	X	
M-IIa-230905-210507	7		
M-IIa-260606-260606	7		
M-IIb-050307-310801	7	X	
M-IIa-100608-230905	6	X	
M-IIa-230905-241006	6		

* *profils similaires*

L'évaluation des fréquences relatives des profils des souches alimentaires et humaines lors de la surveillance microbiologique hebdomadaire de la listériose par le CNRL est importante. Un dépassement de seuil avec un profil rare permet de suspecter une souche d'une denrée importée et peut permettre une investigation épidémiologique plus « facile » qu'un profil circulant largement en France. Une alerte-produit avec des souches alimentaires de profil rare associées à des souches humaines avec des profils similaires entraîne une investigation des cas humains par l'InVS au moyen du questionnaire alimentaire et des investigations auprès du patient. En outre, l'information de rareté ou d'absence au sein de la base des souches alimentaires du CNRL d'un pulsotype donné associé à des cas cliniques peut conduire à requérir des informations auprès des autres pays européens par le biais de la plateforme EPIS de l'ECDC.

Souches isolées de l'environnement

En 2013, 175 souches (2013 : 246 souches, soit -29%) provenant de l'environnement ont été reçues au CNRL, adressées par les laboratoires vétérinaires départementaux (n=28) et des laboratoires privés (n=147) et, suite aux analyses en conformité à l'article 5 du règlement européen EC 2073/2005 modifié sur les prélèvements de surface en agro-alimentaire et au guide complémentaire à la norme EN ISO 18593 sur les prélèvements de surface pour *L. monocytogenes* "Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *L. monocytogenes* " (<https://eurl->

listeria.anses.fr/en/minisite/listeria/guidelines-sampling-food-processing-area-and-equipment-detection-listeria-4). Ces souches se répartissaient en 157 souches de *L. monocytogenes*, 4 souches de *L. innocua*, et 1 souche non *Listeria*. 12 souches ont été réceptionnées au CNRL, mais non caractérisées à la demande des autorités compétentes.

La répartition par groupe PCR des 157 souches de *L. monocytogenes* est la suivante :

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a): 114 souches (73%) (2013 : 140)
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7): 13 souches (8%) (2013 : 25)
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c): 8 souches (5%) (2013 : 15)
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e): 22 souches (14%) (2013 : 32)
- groupe PCR L (autres sérovars, mais sérotypée 1/2a): 0 souche (0%) (2013 : 1)

Comme pour les souches isolées d'aliments, les souches des groupes PCR IIa, IIb et IIc sont majoritaires, et représentent 86 % des souches de *L. monocytogenes* isolées de l'environnement.

Les profils de macrorestriction d'ADN majeurs associés aux souches de l'environnement (fréquence >5) sont différents de ceux identifiés en 2013 sont par ordre décroissant : M-IIa-190410-010607bis, M-IIa-230705-190308, M-IVb-200792-200792 et M-IIa-230905-230905. Le profil M-IIa-190410-010607bis rencontré en 2013 n'était pas représenté en 2012. On retrouve ceux des souches alimentaires majoritaires. Seulement, le profil M-IVb-200792-200792 fait partie des profils des souches cliniques majoritaires.

Ces données ne sont pas nécessairement significatives vu le relativement faible nombre de souches d'origine environnementale reçu au CNRL. De plus, la majorité des souches de l'environnement sont d'origines agro-alimentaires ou issues de surface de réfrigérateurs lors d'enquêtes alimentaires. Elles ne correspondent pas à des souches véritablement isolées de l'environnement (sol, eau, boue) qui seraient utiles pour effectuer des études comparatives phylogénétiques, de virulence, d'acquisition/sélection de gènes, avec les souches alimentaires et cliniques.

2.5. BILAN DES INVESTIGATIONS, DEPASSEMENTS DE SEUIL ET ALERTES

Le détail des dépassements de seuil et les investigations qui en découlent sont des informations confidentielles de la Cellule Listeria. Ils ne peuvent faire l'objet d'une analyse détaillée dans ce rapport d'activités et ne peuvent pas être divulgués à des tiers sans autorisation.

Suspensions d'infections nosocomiales

À 27 reprises en 2014 (contre 15 en 2013), le diagnostic de plusieurs cas de listériose groupés temporellement et géographiquement (même hôpital, voire même service) a fait suspecter une source nosocomiale. 3 bactériémies contractées chez des patients hospitalisés depuis plus de 15 jours ont été également investiguées.

Le CNRL a transmis à la cellule *Listeria* en février 2014 les demandes des hygiénistes d'établissements de soins, dont particulièrement les EPHAD, demandant des recommandations pour la maîtrise du danger *Lm* pour l'alimentation dans les établissements de soins: critères microbiologiques à appliquer par rapport aux populations à risque et la gestion des alertes-produits.

Demande des ARS et CIRE

Le CNR a été sollicité en 2014 par :

- l'ARS du Languedoc-Roussillon pour investiguer une augmentation du nombre de cas ;
- l'ARS de la Réunion concernant 2 cas de listériose ;
- la CIRE Océan Indien concernant 4 cas de listériose survenus à la Réunion ;
- la CIRE Alsace concernant 4 cas de listériose.

Dépassements de seuils

En 2013, le CNRL a notifié 17 dépassements de seuil (2013: 11) (Tableaux 17 et 18, Figure 23). Cette valeur est stable par rapport aux années précédentes : 9 à 16 par an entre 2006 et 2013. Cependant il faut noter que le système a changé en 2012 avec l'identification des profils endémiques et la mise en œuvre de mesures de surveillance spécifiques.

Tableau 17. Synthèse des dépassements de seuils effectués par le CNRL en 2014. En jaune, les pulsotypes endémiques

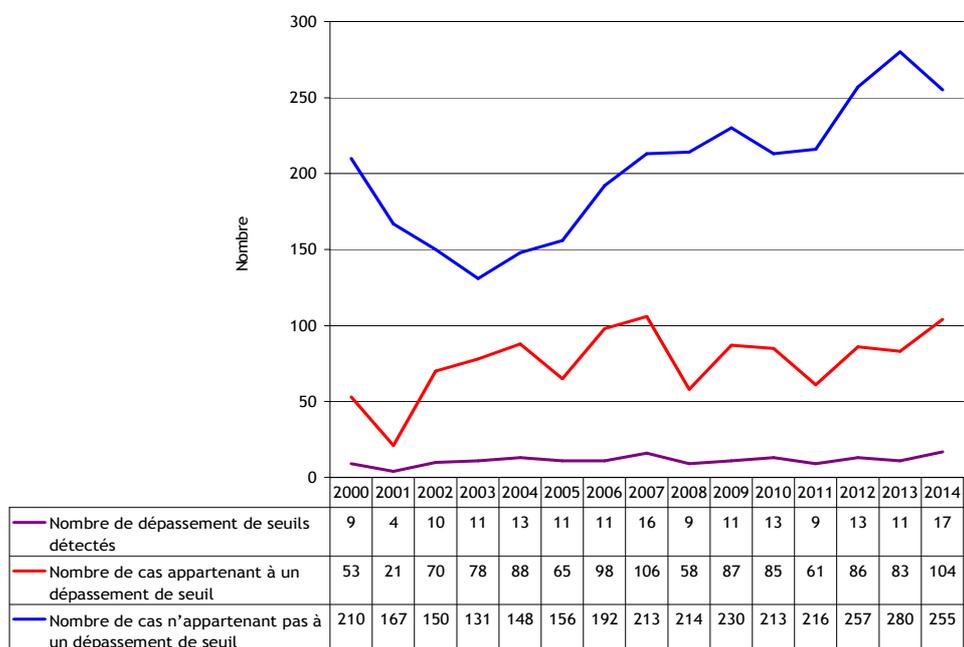
Dépassement de seuil	Nombre de cas	Date du dépassement de seuil	Date de clôture	Caractéristiques des souches		
				Groupe PCR	Profil Ascl	Profil Apal
L13/08*	21	17/09/2013	01/09/2014	IVb	210792	210792
L13/09*	4	01/10/2013	01/09/2014	IVb	071207	071207
L14/01	6	07/01/2014	27/01/2014	IIa	010901	020701
L14/02	2	27/01/2014	05/05/2014	IVb	011001	160602
L14/03	11	10/02/2014	10/03/2014	IIa	241006	090209bis
L14/04	5	10/03/2014	20/05/2014	IVb	270801	050506
L14/05*	5	10/03/2014	22/04/2014	IIa	210408	150807bis
L14/06*	6	16/06/2014	18/08/2014	IIa	210408	150807bis
L14/07	3	16/06/2014	28/07/2014	IIb	231006	310801
L14/08	3	20/06/2014	04/08/2014	IIa	050207	050207
L14/09	4	28/07/2014	18/08/2014	IVb	011001	160602
L14/10	3	12/08/2014	01/09/2014	IIa	241006	090209bis
L14/11	8	19/08/2014	01/09/2014	IIb	010107	010107bis
L14/12	5	25/08/2014	12/11/2014	IIb	310801	310801bis
L14/13	4	22/09/2014	12/11/2014	IVb	011001	160602
L14/14	4	22/09/2014	27/10/2014	IVb	151005	111206
L14/15	7	30/09/2014	03/11/2014	IIa	010901	020701
L14/16	3	15/12/2014	20/01/2015	IVb	210792	210792
L14/17	21	22/12/2014	20/01/2015	IVb	011001	160602

* fusionné lors de l'investigation, épidémie Quenelles décrite dans le rapport d'activité du CNRL 2013.

235 souches (2013 : 315) étaient concernées, se décomposant de la façon suivante : 116 souches humaines (correspondant à 104 cas humains), 106 souches alimentaires, 12 souches d'environnements agro-alimentaires et 1 souche vétérinaire. 104 (88%) souches alimentaires et environnementales provenaient des souches d'alertes-produits DGAL.

Les souches humaines reliées à un dépassement de seuil représentent ainsi 32 % du total des souches humaines reçues au CNRL en 2014 (2013 : 23%). Les formes cliniques de ces cas en 2014 associés à un dépassement de seuil sont proches de ceux de 2013: N (30%), S (52%), A (3%) et MN (15%).

Tableau 18. Dépassements de seuil de listériose, cas associés à des dépassements de seuil et cas sporadiques, France, 2000-2014 (modifié de Goulet et coll., 2008 (26, 28))

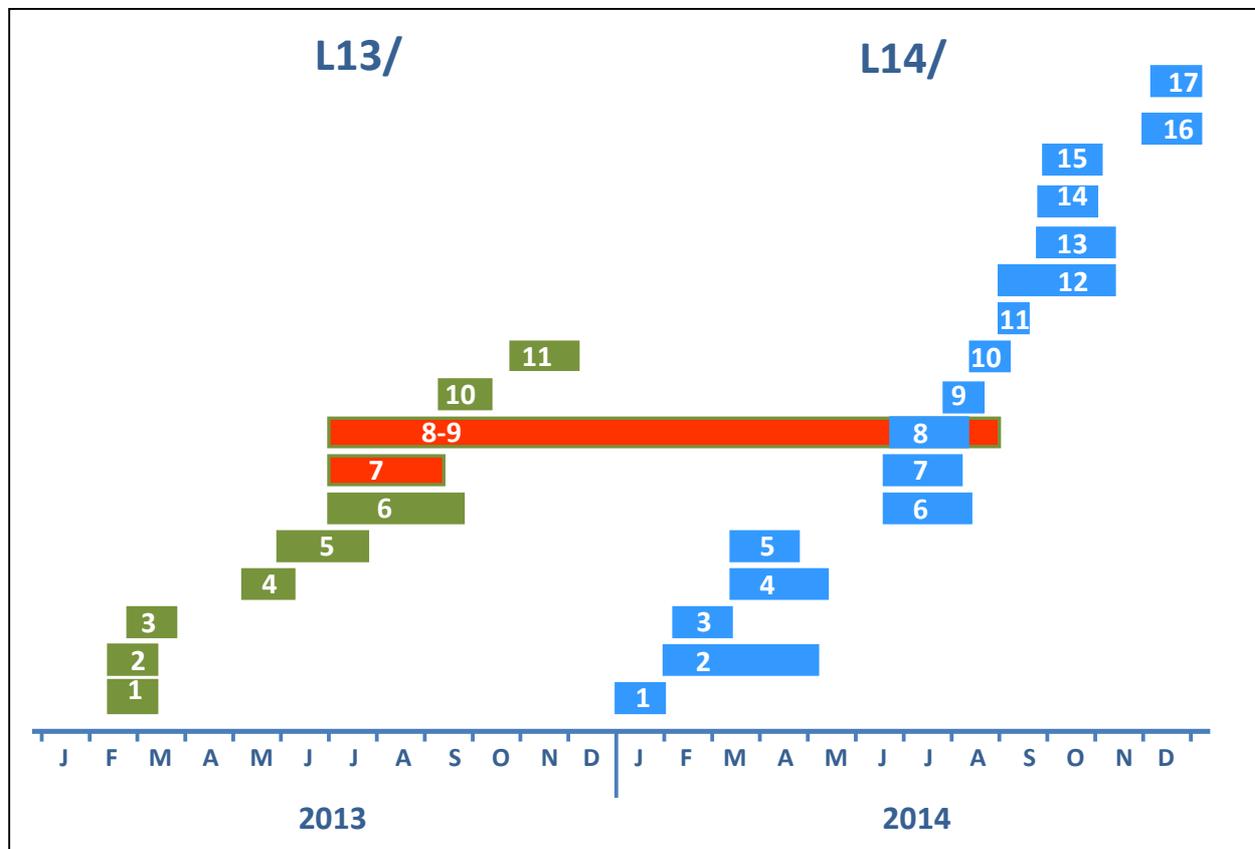


Les souches impliquées appartenait majoritairement au groupe PCR IVb (61%), puis au groupe PCR IIa (23%) (Tableau 20). Le profil majoritaire en 2014 est M-IVb-011001-160602 et non le profil endémique M-IVb-210792/210792 comme en 2013. Ce dernier profil M-IVb-011001-160602 semble augmenter en nombre de dépassements de seuil. La prépondérance du profil M-IIa-241006-241006 pour les souches alimentaires ne s'est pas traduite en 2014 par un dépassement de seuil par rapport à la situation en 2012 et 2013.

Depuis 2006, 1 à 2 nouveaux profils donnaient des dépassements de seuil, mais en 2014, 4 nouveaux profils ont donné un dépassement de seuil L15/03, L15/05, L15/07 et L15/10.

En 2014, 2 dépassements de seuils ont été reliés épidémiologiquement, avec confirmation microbiologique, à des aliments.

Figure 23. Répartition temporelle des dépassements de seuil en 2013 et 2014
 (Les encadrés bleus indiquent les dépassements de seuil en 2014, les encadrés verts indiquent les dépassements de seuil en 2013 ; les rectangles rouges sont les dépassements de seuil secondairement qualifiés d'épidémies par la cellule *Listeria*). (Modifié de M. Tourdjman, InVS)



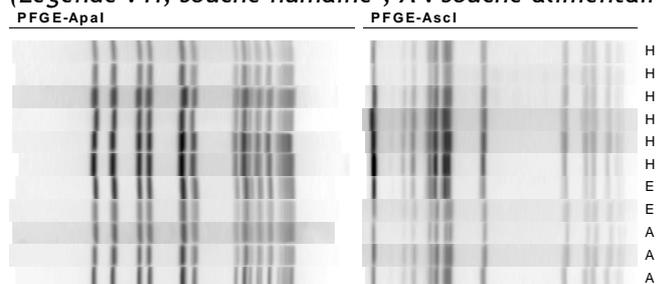
Toxi-Infection Alimentaire Collective et Epidémies

Aucune toxi-infection alimentaire collective n'a été relevée en 2014.

En accord avec l'INVS, les dépassements de seuil L14/05 et L14/06 sont classables en une épidémie (ou cas groupés), mais ceci est à confirmer par la cellule *Listeria*.

Le dépassement de seuil L14/11 avec le profil M-IIb-010107-010107bis et du ST224 a été investigué en même temps qu'une épidémie danoise liée à un produit de charcuterie et gérée par le Statens Serum Institute (SSI) de Copenhague.

Figure 24. Profils PFGE *Ascl/Apal/SmaI* des souches humaines et alimentaires d'une épidémie en 2014
 (Légende : H, souche humaine ; A : souche alimentaire)



Alertes-produits DGAL

En 2014, 826 souches (947 en 2013, 753 en 2012, 495 en 2011, 659 en 2010, 474 en 2009, 660 en 2008, 413 en 2007, 300 souches en 2006) ont été adressées au CNRL dans le cadre des 308 alertes produits DGAL et DDPP (314 en 2013, 268 en 2012, 282 en 2011, 314 en 2010, 332 en 2009, 280 en 2008, 198 en 2007, 200 en 2006). Ces souches se répartissaient en 744 souches alimentaires et 82 souches d'environnements agro-alimentaires. Le nombre de souches par alerte produit variait de 1 à 32 souches.

Le taux d'exhaustivité de récupération des souches d'alertes déterminé est de 73% (72% en 2013, 76% en 2012 et 2011, 81% en 2010, 67% en 2008 et 62% en 2009).

Le non-envoi des souches 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 < 100 UFC/g n'aboutissent pas à un envoi par le laboratoire au CNRL
- Le client peut refuser l'envoi des souches au CNRL ;
- Les souches ne sont pas toujours conservées par le laboratoire ou sont non viables.

Comme en 2012 et 2013, 100% des souches de *Lm* issues d'aliments analysés spécifiquement pour *L. monocytogenes* dans le cadre des alertes-produits ont été confirmées comme *L. monocytogenes*.

La répartition par groupe PCR des 826 souches de *Lm* issues d'aliments et d'échantillons de l'environnement analysés spécifiquement pour *Lm* dans le cadre des alertes-produits était la suivante:

- Groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a) : 498 souches (60% contre 67% en 2013),
- Groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7) : 100 souches (12% contre 9% en 2013),
- Groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c) : 58 souches (7% contre 7% en 2013),
- Groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) : 170 souches (21% contre 16% en 2013),
- Groupe PCR L (sérovars 4a, 4ab, 4c) : 0 souche (0% contre <1% en 2013)

Les profils *Ascl/Apal* de *L. monocytogenes* majoritairement retrouvés (>16 en 2013) dans les alertes produits sont par ordre décroissant M-IIa-241006-241006, M-IIa-230905-230905, M-IVb-200792-200792, M-IIc-301006-301006, M-IVb-151005-151005, M-IIb-160807-150708, M-IIb-010107-010107, M-IIa-190410-010607bis, M-IVb-140907-070907, M-IIa-160807-061007, M-IIa-230905-100214, M-IIa-271006-050207, M-IIa-070408-061007. Les 2 profils majoritaires sont identiques à ceux de 2012 et 2013, mais non majoritaires pour les profils des cas cliniques en 2014.

Les dénombrements en *Listeria monocytogenes* variaient de <10 à 5,2.10⁵ UFC/g.

Alertes produits DGCCRF

Les alertes DGCCRF sont issues des échantillons ne répondant pas aux critères microbiologiques réglementaires pour *L. monocytogenes* lors de l'application du plan de contrôle et de surveillance 2014 pour *Listeria* et lors d'inspections (<http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/contamination-des-aliments-a-distribution-par-listeria-monocytogenes>). En 2014, le CNRL a reçu directement 31 souches des 12 alertes-produits de la DGCCRF, mais aucune souche du LNRL issue des souches des plans de contrôle ou de surveillance avec dépassements de seuil pour l'échantillon étudié.

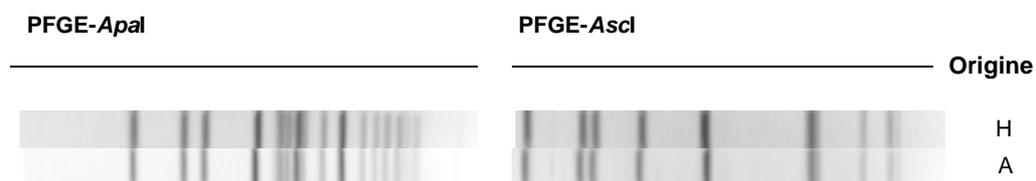
Enquêtes des formes neuroméningées

En 2014, 94% (79/84) des listérioses neuroméningées ont bénéficié de ce type d'enquête contre 97% (92/95) en 2013. Ce chiffre est en augmentation régulière depuis 2006 : 59% en 2006, 62% en 2007, 77% en 2008, 82 % en 2009, 82% en 2010, 96% en 2011, 93% en 2012. Pour 3 cas, le diagnostic a été effectué sur un résultat de PCR sur LCR et non l'isolement de la souche. Selon les rapports communiqués par la DGAL, 25 investigations (32% ; contre 26% en 2013) n'ont pas été suivies d'enquêtes localement donnant lieu à des prélèvements dans le réfrigérateur du patient ou de sa famille.

En 2014, parmi les 6 cas (8%, le plus bas taux depuis 2003(48)) où des souches alimentaires ou de l'environnement du réfrigérateur ont été isolées ; à 4 reprises (67% ; 2013 : 67%), leurs caractéristiques microbiologiques étaient similaires à celles du patient (Figure 25).

Ainsi, les prélèvements à domicile proposés à tous les cas de listériose neuroméningées sont un complément utile à la DO et permettent dans certains cas d'identifier rapidement la source de contamination. Ces investigations permettent en outre de maintenir localement l'expertise nécessaire à des investigations rapides en cas de cas groupés ou d'épidémies dont les investigations nécessitent des prélèvements dans les réfrigérateurs ou les lieux d'achats des familles.

Figure 25. Exemple de résultats de typage PFGE dans une investigation d'un cas de forme neuroméningée (Légende : H, souche humaine ; A : souche alimentaire)



3. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

Le CNRL a également pour mission la mise à jour et la diffusion des connaissances dans le domaine de *Listeria* et de la listériose

- auprès du grand public ;
- auprès des professionnels de santé et du secteur agro-alimentaire afin de les renseigner et les sensibiliser au danger représenté par *L. monocytogenes*.

3.1. CENTRE DE DOCUMENTATION

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 et en obtenir des informations.

3.2. SITE INTERNET

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* dispose d'un site internet en français et en anglais : (<http://www.pasteur.fr/cnr/listeria>).

En Novembre 2014, conformément au souhait de l'InVS, le site web du CNR des *Listeria* a été complètement révisé et incorporé dans le nouveau site des CNR de l'Institut Pasteur regroupé dans le laboratoire LREMS (Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite).

Ce site contient des informations sur ses missions, son activité et ses rapports d'activité, la maladie, des recommandations (Professionnels de santé, opérateurs agro-alimentaires, patients), comment envoyer les souches au CNRL (contrat de prestation, feuilles de renseignements) et ses travaux de recherche. Des liens avec les sites des partenaires du CNRL ont été également établis.

3.3. VEILLE INTERNET

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* est abonné à plusieurs réseaux d'alertes tant en santé humaine qu'en sécurité alimentaire et effectue des filtres de notification via internet afin d'informer par email ses partenaires de la cellule *Listeria* en cas d'épidémies ou d'alertes-produits pouvant toucher la France ou de phénomènes anormaux rapportés sur le web.

3.4. ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS, ACCUEIL DE STAGIAIRES

En 2014, le CNRL a participé à des formations continues de médecins, biologistes, personnels soignants, chefs de laboratoires, techniciens, responsables qualité du secteur agro-alimentaire et hygiénistes des hôpitaux :

- **ADRIA Développement de Quimper**, formation continue « Pathogènes alimentaires » : *Listeria monocytogenes*, Rennes, 25/09/14, A. Leclercq
- **Alpa, Institut Pasteur de Lille**, formation continue «*Listeria* : Bactériologie, Epidémiologie et pouvoir Pathogène des *Listeria* », cycle « Micro-organismes pathogènes et aliments », Lille, 04/06/14, A. Leclercq
- **Séminaire pour le staff de Microbiologie**, Necker Enfants Malades sur « MONALISA », Hôpital Necker Enfants Malades, AP-HP, Paris, 2014, C. Charlier-Woerther
- **Séminaire pour le staff d'Obstétrique**, Cochin Port Royal sur « Actualités Listériose », Hôpital Cochin Port Royal, AP-HP, Paris, 2014, C. Charlier-Woerther
- **Séminaire pour le staff de Maladies Infectieuses**, Bichat Claude Bernard, sur « MONALISA », Hôpital Bichat Claude Bernard, AP-HP, Paris, 2014, C. Charlier-Woerther

- Séminaire pour le staff de Maladies Infectieuses, Hôpital Tenon, sur « Neurolistériose », Paris, Janvier 2014, M. Lecuit.

En 2014, le CNRL a accueilli :

- Mme Alexandra MOURA, chercheur contractuel dans le projet "Génomique des populations des souches de *Listeria monocytogenes*" (projet nr 024511_759116) qui travaille sur le développement du cgMLST.
- Mme Mylène Maury, étudiante en Doctorat sur le thème "Emergence, génomique et évolution de la bactérie pathogène alimentaire *Listeria monocytogenes* ».

3.5. PARTICIPATION A LA REDACTION DE COMMUNICATIONS ECRITES DIDACTIQUES

Le CNRL a participé à l'élaboration des chapitres suivants:

- Le Monnier, A., Leclercq, A., Lecuit, M. Chapitre *Listeria monocytogenes*. Remic 2015, Société Française de Microbiologie.
- Charlier, C., Lecuit, M. *Listériose*. Traité de Médecine. Edition Lavoisier 2014.
- Lecuit, M., Charlier, C. *Listériose*. Chapitre 67 Pilly Edition 2014 et 2015.
- Leclercq, A., A. Oevermann, R. Danguy-des-Déserts, Sophie Granier, Thomas Hammack, Karen Jinneman, Yi Chen, Robert Rathbone, Garlon Riegler. *Listeria monocytogenes*. Chapitre 2.9.7. In OIE Terrestrial Manual. World Organization for Animal Health (OIE), Paris, May 2014.

3.6. ACTIVITE DE CONSEIL

Le CNRL a reçu en 2014, 156 demandes d'information par e-mail (listeria@pasteur.fr) (~3/semaine) et 280 appels téléphoniques (~5/semaine). Il s'agit de l'application du point 4.7 Prestations de conseils de la norme EN ISO 15189 et le point 4.4. Revue de contrat de la norme EN ISO 17025.

Suite à l'étude Monalisa, de nombreux biologistes et cliniciens ayant participé à cette étude sollicitent le CNRL pour des conseils médicaux au regard des cas étudiés.

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 diagnostique, réalisation d'antibiogramme, diagnostic complémentaire par PCR et/ou sérologie)
- demandes de conseils thérapeutiques (ex : alternative thérapeutique en cas d'allergie aux β -lactamines)

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)
- demandes relatives au management de la qualité au CNRL, (procédures et démarches, gestion des non-conformités et/ou erreurs d'aiguillage des souches)

Particuliers

- demandes de conseil de femmes enceintes (prévention, aliments à risque)

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

3.7. EXPERTISES

Expertises de souches

En 2014, le CNRL a reçu 65 souches isolées de patients ou d'aliments, adressées par des laboratoires de pays étrangers pour expertise (Cf. Annexe C).

Le CNRL a également reçu 60 souches d'origine environnementale et/ou alimentaire (116 en 2014), adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour leur identification et leur caractérisation dans un cadre de prestations privées payantes.

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

En 2014, les responsables du CNRL ont contribué et participé aux réunions sur la révision des normes françaises, européennes et internationales pour les *Listeria* en microbiologie de la chaîne alimentaire et à l'harmonisation européenne (ECDC/EFSA) et internationale (Pulsenet) des méthodes de groupage PCR et de typage moléculaire des *L. monocytogenes*.

Expertise de publications et de projets scientifiques

En 2014, le CNRL a participé à la relecture de plus de 15 articles dans des journaux nationaux et internationaux à comités de lecture, et a expertisé des projets scientifiques. C. Charlier Woerther est Editeur « Maladies Infectieuses » à la Presse médicale et A. Leclercq est membre du comité éditorial de Journal of Food Protection et Food Analytical methods.

Expertises dans des comités nationaux, européens ou internationaux

Les responsables du CNRL ont participé comme experts ou conseillers dans 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 TC275/WG6, Comité français Afnor V08B, Comité International de normalisation en microbiologie des aliments ISO TC34/SC9, Comité d'experts spécialisés CES « Evaluation des risques biologiques des aliments » de l'ANSES.

Conseil auprès de Ministère

De par sa participation à la cellule *Listeria*, le CNRL est en contact avec les services concernés des Ministères de l'Economie, de l'Agriculture et de la Santé. Le CNRL contribue à la préparation d'avis de l'ANSES en participant à l'étude de saisine de l'ANSES.

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

Le CNRL participe en relation avec l'InVS et les Ministères concernés aux réponses aux demandes par les systèmes EPIS, RASFF, INFOSAN sur des épidémies ou des cas groupés ou des produits alimentaires contaminés.

3.8. RETOUR D'INFORMATIONS

La surveillance microbiologique de la listériose en France se fonde sur l'envoi volontaire et centralisé au CNRL de souches isolées de patients par les laboratoires médicaux, et sur celui de souches non humaines par les laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments.

Dans chaque cas, un compte-rendu détaillé des analyses effectuées pour chaque souche est envoyé au laboratoire expéditeur.

En cas d'atypies sur la souche ou si le cas clinique est atypique, le laboratoire expéditeur est contacté par l'un des responsables pour échanges d'informations ou études complémentaires éventuelles.

L'échange d'informations avec nos correspondants est un élément qui a également pour objectif de favoriser la participation des laboratoires, pivot de la surveillance et de son exhaustivité.

Le CNRL participe à la réunion multidisciplinaire de chimiothérapie infectieuse (RICAI) sur les sujets en rapport avec son activité, comme en 2014 la présentation du PHRC Monalisa par C. CHARLIER-WOERTHER.

En 2009, le CNRL avait publié un point sur la listériose dans la Revue du praticien (8). En 2011-2012, le CNRL a été corédacteur de la fiche ANSES sur *L. monocytogenes* (www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-Listeria.pdf). En 2012, le CNRL avait réalisé une synthèse de la surveillance humaine et alimentaire en France de la listériose qui a été publiée dans un numéro hors série du bulletin épidémiologique hebdomadaire (29, 49).

En 2014, l'InVS a réalisé une synthèse sur la « *listériose humaine : une zoonose d'origine alimentaire* » avec le CNR qui a été publiée dans la Revue Francophone des Laboratoires (51). Ces publications ci-dessus sont très utiles au CNR pour donner de l'information à ses correspondants en langue française ce qui en facilite leur prise de connaissance.

Depuis 2011, le CNR étudie de façon rétrospective les formes rares de listérioses : infections ostéo-articulaires (10) et cholécystites (9).

Depuis 2007, le rapport d'activité du CNRL 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.

4. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNRL

Le CNR des *Listeria* est affilié à l'Unité de Biologie des Infections (Institut Pasteur).

Chaque année, l'Institut Pasteur attribue un budget propre au CNRL et au CCOMS en complément de celui octroyé par l'InVS pour le CNRL. Outre son utilisation pour le financement de personnels, d'équipement 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.

L'activité de recherche du CNR porte sur 3 volets :

- recherche appliquée, qui découle directement de notre activité de référence, et vise à améliorer les aspects techniques et diagnostiques.
- recherche microbiologique, qui dérive de notre activité de caractérisation des souches *in vitro*, au plan génotypique et phénotypique: il vise à mieux comprendre le profil évolutif et la variabilité intra- et inter-spécifique de *L. monocytogenes*.
- recherche physiopathologique, à l'interface des activités épidémiologiques, cliniques et microbiologiques du CNRL et des activités de recherche de l'Unité.

En 2014, le CNRL a mis au point une méthode de séquençage génomique à haut débit des souches de *L. monocytogenes* et de typage moléculaire des souches basées sur le core génome MLST (Annexe C.2.).

Les méthodes en développement ou les recherches déjà citées dans l'annexe C ne sont pas décrites dans ce chapitre. Les paragraphes en anglais correspondent soient aux abstracts des publications, soient aux actes de colloques non disponibles sur le web.

4.1. CONTRIBUTIONS AUX ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

Analyse des Urgent Inquiries ECDC

En collaboration avec C. Goessner (ECDC)

Article accepté dans Eurosurveillance. C. Gossner, B. de Jong, Christian J.P.A. Hoebe, D. Coulombier, and European Food and Waterborne Diseases Study Group. Event-based surveillance of food- and waterborne diseases in Europe: A six-year review of urgent inquiries, 2008-2013. Sous presse.

Abstract: Since 2007, the European Centre for Disease Prevention and Control is coordinating the food and waterborne outbreak alerts, so called urgent inquiries (UI), at the European Union (EU) level. The main objective of the UI is to detect multi-country outbreaks and thereafter facilitate the investigations. The analysis of six years of UI (2008-2013) provides an overview of the food and waterborne threats for the EU and suggests improvement for outbreak detection and surveillance in the EU region.

During the studied period, 215 UI were launched, the majority of them (63%) on salmonellosis. For 110 (51%) UI, a potential food vehicle of infection was identified, vegetables being the most reported category (31%). Twenty-eight percent of the outbreaks reported had an international dimension.

The UI allowed early detection of multi-country outbreaks, facilitated the identification of the suspected vehicles, and consequently contributed to the timely implementation of control measures. The introduction of the epidemic intelligence information system platform in 2010 has strengthened the role of the FWD network in facilitating the timely exchange of information between countries.

Comparaison et échanges du système de surveillance microbiologique (passage au Whole Genome Sequencing) et épidémiologique américain et français des *Listeria*

Personnes impliquées au CNRL : V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, M. Lecuit
Sylvain Brisse, Unité de génomique évolutive des microbes, Institut Pasteur
Henriette de Valk ainsi que Mathieu Tourdjman, InVS ; Dr Peter Gerner-Smidt, microbiologiste, et Dr John BESSER, épidémiologiste, CDC d'Atlanta.

Activité décrite dans le chapitre 2.2.

4.2. ANALYSES CLINIQUES

Etude MONALISA: Multicentric Observational National Analysis of LISTERiosis and *Listeria*

Personnes impliquées au CNRL : C. Charlier-Woerther - A. Leclercq - M. Lecuit

Les données disponibles sur la présentation clinique, biologique, les facteurs pronostiques de l'infection sont issus d'études rétrospectives hétérogènes. Le CNRL a donc décidé de mettre en place une étude prospective cas-témoins permettant de recueillir toutes les données cliniques de patients atteints de listériose et de patients contrôle, mais également les échantillons biologiques issus de ces patients. MONALISA a été menée dans le cadre du programme hospitalier de recherche clinique (PHRC), sous la direction du Pr. M. Lecuit et coordonné par le Dr C. Charlier, Praticien Hospitalo-universitaire du service des Maladies Infectieuses de l'hôpital Necker-Enfants Malades. La première phase d'inclusion s'est déroulée de Novembre 2009 à Juillet 2013. Elle a permis de collecter les échantillons de 818 malades (427 infections S, 252 infections N et 107 infections MN) et 456 témoins.

(Site : http://www.recherchecliniquepariscentre.fr/wp-content/uploads/2012/01/monalisa_r%C3%A9sum%C3%A9_20090925_LLE.pdf).

Les inclusions des formes neurologiques et materno-néonatales se poursuivent. Depuis Septembre 2013 ont été inclus 126 malades, dont 81 formes N, 39 formes MN et 6 autres formes supplémentaires.

Objectif principal: Étudier les facteurs de risque de survenue d'une listériose (cliniques, biologiques et génétiques), étudier les facteurs pronostiques de mortalité liés à la listériose.

Objectifs secondaires:

- Décrire la présentation actuelle clinique, biologique et radiologique de la listériose et son histoire naturelle ;
- Décrire les pratiques thérapeutiques dans les trois formes de l'infection.

Étude ancillaire : Évaluer des outils diagnostiques fondés sur la sérologie et la PCR et identifier d'éventuelles prédispositions génétiques à cette infection.

Méthodologie :

- Étude prospective nationale multicentrique de cohorte avec étude cas /témoin emboîtée.
- Volet clinique : recueil de données cliniques, biologiques, radiologiques et un interrogatoire alimentaire.
- Volet biologique : constitution d'une bibliothèque comportant un échantillon de sang total, de sérum, de LCR et de tissu quand il sera disponible.

Critères d'inclusion :

- Cas : patient avec une listériose prouvée (culture positive du sang, LCR, placenta, ou de tout autre site normalement stérile, ou d'un prélèvement fœtal/néonatal) diagnostiquée dans les 14 jours précédant l'inclusion.
- Témoins : patient présentant un terrain et un tableau clinique compatible avec une listériose immunodéprimé fébrile, patient présentant un tableau neurologique fébrile, femme enceinte fébrile et n'ayant pas de listériose (hémocultures négatives et PCR négative si réalisée).

Les inclusions sont achevées et les premières analyses des données ont été présentées dans des conférences nationales et internationales.

A la suite de cette étude, nous souhaitons étudier plusieurs aspects spécifiques de cette cohorte :

MONALISA-RADIO. Analyse des imageries cérébrales de 70 patients avec neurolistériose. Cette étude permettra de caractériser la présentation radiologique et d'identifier de nouveaux facteurs pronostiques. Ce projet est un des volets du projet Sinergia (financé par le fonds national suisse pour la recherche scientifique) visant à comparer dans une optique One Health les neurolistérioses du bétail et de l'homme (caractérisation génotypique des souches, modèles animaux, confrontation radiologique) en collaboration avec A. Oervermann et Joachim Frey (Université de Berne).

MONALISA-BABY. L'analyse du devenir à 5 ans des enfants avec listériose périnatale débutera 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 (collaboration avec PY Ancel, responsable de la cohorte EPIPAGE2).

Cohorte nationale Observationnelle des Méningites Bactériennes communautaires de l'Adulte (COMBAT)

Personnes impliquées au CNRL : A. Leclercq - M. Lecuit

Le CNRL a contribué à cette étude en définissant les données microbiologiques à recueillir pour les cas de méningite à *Listeria* qui s'intègrent dans un CRF électronique, et participera de façon prospective à compléter ce CRF pour chaque souche de cas de formes neuroméningées incluses dans cette cohorte.

L'objectif principal de cette étude est d'identifier les déterminants du décès intra-hospitalier des méningites bactériennes de l'adulte. Les objectifs secondaires sont : (i) de décrire les caractéristiques épidémiologiques des méningites bactériennes communautaires de l'adulte, leur évolution et leurs liens avec le statut vaccinal de l'adulte et de son entourage ; (ii) caractériser les échecs cliniques et microbiologiques et leurs déterminants (pharmacologiques, microbiologiques, immunologiques, etc.), et (iii) d'analyser les déterminants des séquelles psycho-sensorielles et de la non-reprise de l'activité professionnelle à 1,6 et 12 mois.

En 2014, 6 souches humaines ont été intégrées à COMBAT.

Infections endovasculaires à *Listeria monocytogenes*

Personnes impliquées au CNRL : C. Charlier-Woerther - A. Leclercq - M. Lecuit
Article en préparation

Abstract: Along with the classical forms of infection by *Lm* (septicemia, central nervous system and maternal-neonatal infections), cases of endovascular infections have been seldom reported since 1955. Their epidemiological, clinical and microbiological features are poorly known.

Retrospective study of 21 endovascular cases reported to the French National Reference Center for *Listeria* from January 1987 to March 2013.

Lm-associated endovascular infection mostly involves older male patients with prosthetic device and comorbidity. They require intensive treatment based on adequate prolonged antimicrobial therapy. They are still associated with high mortality (38%).

Infection ostéo-articulaire à *Listeria monocytogenes* : à propos d'un cas

Personne impliquée au CNRL : A. Leclercq

Collaboration avec un laboratoire correspondant du CNR, Laboratoire Gen-Bio, de Clermont-Ferrand
Poster présenté à la 34^{ième} Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, Paris 27 Novembre 2014. P. Chatron, A. Leclercq, O. Lesens, P. Costis, T. Chatenet. Poster. Infection ostéo-articulaire à *Listeria monocytogenes* : à propos d'un cas.

Abstract : A ce jour, les cas d'infections ostéo-articulaires à *Listeria monocytogenes* restent rares. Nous rapportons l'observation d'une patiente de 67 ans porteuse de deux prothèses totales de hanche depuis 4 ans dans un contexte de polyarthrite rhumatoïde sévère. Au décours d'une chirurgie rachidienne est apparu un tableau clinique et biologique de sepsis accompagné de douleurs de hanche droite ayant motivé la réalisation de 7 prélèvements opératoires suivis de l'instauration d'une antibiothérapie probabiliste par Vancomycine et Ceftriaxone en accord avec le protocole CLIN de l'établissement. Les prélèvements furent ensemencés sur milieu solide et liquide pour une durée maximale de 16 jours. 6 des 7 cultures étaient positives à J10 à *Listeria monocytogenes*. Le profil d'antibiorésistance était celui d'une souche sauvage (génosérogroupe IIa). Compte tenu des antécédents de la patiente, de l'amélioration du tableau clinique, un lavage articulaire a été préféré au remplacement prothétique complet. L'antibiothérapie a été modifiée avec une association Amoxicilline - Gentamycine 3 semaines puis relais oral 10 semaines par Amoxicilline - Triméthoprime/Sulfaméthoxazole. Les bilans clinique et biologique sont satisfaisants à 3 mois. La patiente est actuellement sous Amoxicilline jusqu'à la consultation d'octobre. Comme le suggèrent les données de la littérature, le vieillissement de la population associée à l'augmentation du nombre de patients traités par immunosuppresseurs ou immunomodulateurs va contribuer à l'augmentation de l'incidence de cas similaires à celui-ci. Les laboratoires amenés à traiter ces prélèvements ostéo-articulaires doivent mettre en place les moyens nécessaires à l'isolement et l'identification de pathogènes difficiles tout en évitant les contaminations et connaître les facteurs de risque d'infections à microorganismes atypiques tel que *Listeria monocytogenes*.

4.3. METHODES DE DIAGNOSTIC ET ATYPIES DES SOUCHES

Bacteriophages as a driving force for serovar diversity in *Listeria monocytogenes*: serovar 3 and 7 feature mutations in teichoic acid glycosylation genes of serovar 1/2

Personnes impliquées au CNRL : A. Leclercq - M. Lecuit

*En collaboration avec Marcel R. Eugster et Martin J. Loessner (Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zurich, Switzerland). Le CNRL ayant communiqué sa collection rare de *L. monocytogenes* de serotype 7.*

Article publié : Eugster, M. R., Morax, L. S., Huls, V. J., Huwiler, S. G., Leclercq, A., Lecuit, M., Loessner, M. J. 2015. Bacteriophage predation promotes serovar diversification in *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol. DOI : 10.1111/mmi.13009

Abstract: *Listeria monocytogenes* is a bacterial pathogen classified into distinct serovars (SV) based on somatic and flagellar antigens. To correlate phenotype with genetic variation, we analyzed the wall teichoic acid (WTA) glycosylation genes of SV 1/2, 3, and 7 strains, which differ in decoration of the ribitol-phosphate backbone with N-acetylglucosamine (GlcNAc) and/or rhamnose. Inactivation of lmo1080 or the dTDP-l-rhamnose biosynthesis genes rmlACBD (lmo1081-1084) resulted in loss of rhamnose, whereas disruption of lmo1079 led to GlcNAc deficiency.

We found that all SV 3 and 7 strains actually originate from a SV 1/2 background, as a result of small mutations in WTA rhamnosylation and/or GlcNAcylation genes. Genetic complementation of different SV 3 and 7 isolates using intact alleles fully restored the characteristic SV 1/2 WTA carbohydrate pattern, antisera reactions, and phage adsorption. Intriguingly, phage-resistant *L. monocytogenes* EGDe (SV 1/2a) isolates featured the same glycosylation gene mutations, and were serotyped as SV 3 or 7,

respectively. Again, genetic complementation restored both carbohydrate antigens and phage susceptibility.

Taken together, our data demonstrate that *L. monocytogenes* SV 3 and 7 originate from point mutations in glycosylation genes, and we show that phage predation represents the major driving force for serovar diversification and evolution of *L. monocytogenes*.

4.4. ETUDES DE LA VIRULENCE

Structural Basis for the Inhibition of the Chromatin Repressor BAHD1 by the Bacterial Nucleomodulin LntA

Personnes impliquées au CNRL (Screening des souches du CNRL): M. Ragon - A. Le Monnier- H. Dieye - A. Leclercq

En collaboration avec H. Bierne (Institut Pasteur, Unité des Interactions Bactéries-Cellules)

Article publié: Lebreton A, Job V, Ragon M, Le Monnier A, Dessen A, Cossart P, Bierne H. 2014. Structural basis for the inhibition of the chromatin repressor BAHD1 by the bacterial nucleomodulin LntA. mBio 5(1):e00775-13. doi:10.1128/mBio.00775-13.

Abstract: The nucleus has emerged as a key target for nucleomodulins, a family of effectors produced by bacterial pathogens to control host transcription or other nuclear processes. The virulence factor LntA from *Listeria monocytogenes* stimulates interferon responses during infection by inhibiting BAHD1, a nuclear protein involved in gene silencing by promoting heterochromatin formation. So far, whether the interaction between LntA and BAHD1 is direct and sufficient for inhibiting BAHD1 activity is unknown. Here, we functionally characterized the molecular interface between the two proteins in vitro and in transfected or infected human cells. Based on the known tridimensional structure of LntA, we identified a dilysine motif (K180/K181) in the elbow region of LntA and a central proline-rich region in BAHD1 as crucial for the direct LntA-BAHD1 interaction. To better understand the role played by the dilysine motif in the functionality of LntA, we solved the crystal structure of a K180D/K181D mutant to a 2.2-Å resolution. This mutant highlights a drastic redistribution of surface charges in the vicinity of a groove, which likely plays a role in nucleomodulin target recognition. Mutation of the strategic dilysine motif also abolished the recruitment of LntA to BAHD1-associated nuclear foci and impaired the LntA-mediated stimulation of interferon responses upon infection. Last, the strict conservation of residues K180 and K181 in LntA sequences from 188 *L. monocytogenes* strains of different serotypes and origins further supports their functional importance. Together, these results provide structural and functional details about the mechanism of inhibition of an epigenetic factor by a bacterial nucleomodulin.

Importance: Pathogens have evolved various strategies to deregulate the expression of host defense genes during infection, such as targeting nuclear proteins. LntA, a secreted virulence factor from the bacterium *Listeria monocytogenes*, stimulates innate immune responses by inhibiting a chromatin-associated repressor, BAHD1. This study reveals the structural features of LntA required for BAHD1 inhibition. LntA interacts directly with a central domain of BAHD1 via a surface patch of conserved positive charges, located nearby a groove on the elbow region of LntA. By demonstrating that this patch is required for LntA function, we provide a better understanding of the molecular mechanism allowing a bacterial pathogen to control host chromatin compaction and gene expression

Etude de l'expression par *L. monocytogenes* d'InIA

Personnes impliquées au CNRL : H. Dieye - V. Chenal-Francisque - A. Leclercq - M. Lecuit

L'internaline (InIA) de *Lm* permet son internalisation dans les cellules épithéliales et la traversée des barrières intestinale et placentaire *in vivo*. C'est un facteur de virulence majeur de la bactérie. Certaines souches expriment une InIA tronquée, non-fonctionnelle pour l'entrée, et donc associée à une hypovirulence. Nous avons étudié un grand nombre d'isolats du CNRL préalablement typés par MLST et pour lequel l'intégralité du gène *inIA* a été également séquencé. Les résultats de cette étude vont aboutir à une méthode simple de caractérisation des souches quant à leur expression en surface d'InIA. Nous investiguons également la fréquence de cette troncature au sein de différents groupes PCR de *L. monocytogenes*, et étudions les caractéristiques phénotypiques de ces souches exprimant une InIA tronquée.

4.5. TAXONOMIE

Suite au congrès ISOPOL de 2013, le CNRL participe à la révision du genre *Listeria* et l'inclusion de nouvelles espèces en relation avec les données récentes de la génomique.

Ainsi, en collaboration avec l'Université de Cornell, Food Science Department, il a étudié les espèces récemment publiées de *L. aquatica*, *L. floridensis*, *L. cornellensis*, *L. grandensis*, et *L. riparia* (17).

4.6. DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE TYPAGE MOLECULAIRE

Séquençage du génome complet d'isolats de L. monocytogenes

Personnes impliquées au CNRL : A. Moura - V. Chenal-Francisque - A. Leclercq - M. Lecuit

En collaboration avec Sylvain Brisse et M. Maury, Unité de génomique évolutive des microbes, Institut Pasteur.

Le séquençage de génomes complets d'isolats représentatifs des souches cliniques et alimentaires est en cours. Le pipeline de séquençage (Extraction ADN - Librairie - Séquençage) a été validé en 2014. Leur annotation et la comparaison de ces génomes permettront de mieux comprendre la biodiversité de *Listeria*, d'identifier des génotypes éventuellement associés à l'hypervirulence et/ou l'hypovirulence, et de développer des outils d'analyse et de typage qui pourront être intégrés à la surveillance épidémiologique et microbiologique de la listériose.

4.7. ETUDE DE LA DIVERSITE DES LISTERIA

Biodiversité des Listeria

Personnes impliquées au CNRL : V. Chenal Francisque - A. Leclercq - M. Lecuit

Financement Institut Pasteur ANSES

En collaboration avec M. Maury et S. Brisse (Unité de Génomique évolutive des Microbes) et avec le LNR de l'ANSES (A. Brisabois et S. Roussel).

Une étude est en cours sur la diversité environnementale des *Listeria* et la dynamique des populations des *Listeria*. Il s'agit d'estimer dans l'environnement la diversité existante et de la comparer à celle des cas humains ou des aliments afin de mieux comprendre la dynamique des populations, pour tester l'hypothèse qu'il existe un filtre entre souches humaines et souches environnementales ou alimentaires. Outre le développement d'outils pour la surveillance nationale, ce projet permettra de relier le génotype de souches à leur potentiel de virulence et épidémique en cas d'alertes.

Les objectifs spécifiques sont :

- Définir avec une grande exactitude les relations phylogénétiques entre les souches cliniques et isolats alimentaires provenant de différents animaux (porcs, produits de la mer, etc.) ;
- Déterminer la prévalence des génotypes étroitement définis dans les échantillons alimentaires et cliniques ;
- Améliorer la compréhension des bases génétiques de la virulence des génotypes de *L. monocytogenes* par un séquençage complet de génome d'isolats représentatifs.

Les données du projet sont en cours d'exploitation au regard des données de génomique.

4.8. ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Détermination de la résistance aux antibiotiques à partir du génome bactérien et du référentiel EUCAST

*Personnes impliquées au CNRL : A. Moura - A. Leclercq - M. Lecuit
En collaboration avec S. Brisse (Unité de Génomique évolutive des Microbes)*

Les tests de susceptibilités aux agents antimicrobiens sont des tests phénotypiques basés sur le référentiel EUCAST en France. Le CNRL évalue la possibilité de cribler les génomes de *Listeria* pour déterminer la faisabilité de détecter des résistances *in silico*.

De même, le CNRL, sur la base des données de ces essais d'antibiorésistance, essaie de définir les seuils pour certains antibiotiques non référencés dans le référentiel EUCAST.

4.9. PROJETS COLLABORATIFS

Le CNRL est associé à des travaux collaboratifs :

- avec des entités de l'Institut Pasteur : Unité de Génomique évolutive des Microbes (S. Brisse), Unité des Interactions Bactéries Cellules (P. Cossart),
- Hôpital Necker-Enfants malades (AP-HP), CIC Necker (MONALISA).
- Projets européens Eranet (Listress, Proantilis)
- un projet international (Sinergia, Fonds national suisse)
- Autres projets de recherche de l'Unité de Biologie des Infections

5. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

La liste des publications du CNRL depuis sa création est disponible et actualisée sur son site web. La liste des publications complémentaires de l'Unité de Biologie des Infections se trouve à l'annexe D.

5.1. PUBLICATIONS NATIONALES

Charlier, C. and M. Lecuit. **Infections et grossesse : un danger pour la mère et l'enfant.** La Presse médicale 2014 ; 43(6): 662-4.

Charlier-Woerther, C., and M. Lecuit. 2014. **Listériose et grossesse.** La Presse Médicale 2014 ; 43(6): 676-82.

Tourdjman, M., Laurent, E., and A. Leclercq. 2014. **Listériose humaine : une zoonose d'origine alimentaire.** Revue Francophone des Laboratoires. 464: 37-44.

5.2. PUBLICATIONS INTERNATIONALES

Girard, D., A. Leclercq, E. Laurent, M. Lecuit, H. de Valk, and V. Goulet. 2014. **Pregnancy-related listeriosis in France, 1984 to 2011, with a focus on 606 cases from 1999 to 2011.** Euro Surveill. 19(38). <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20909>

Leclercq, A., Charlier, C., and M. Lecuit. 2014. **Global burden of listeriosis: the tip of the iceberg.** Lancet Infectious Diseases. 14(11):1027-8.

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. and M. Lecuit. 2014. **Biliary tract listeriosis: analysis of 20 cases.** Medicine. 93(18):e105. doi: 10.1097/MD.000000000000105.

Hmaied, F., S. Helel, V. Le Berre, J. M. Francois, A. Leclercq, M. Lecuit, H. Smaoui, A. Kechrid, A. Boudabous, and I. Barkallah. 2014. **Prevalence, identification by a DNA microarray-based assay of human and food isolates *Listeria* spp. from Tunisia.** Pathol Biol (Paris) 62(1):24-9.

Lebreton A, Job V, Ragon M, Le Monnier A, Dessen A, Cossart P, Bierne H. 2014. **Structural basis for the inhibition of the chromatin repressor BAHD1 by the bacterial nucleomodulin LntA.** mBio 5(1):e00775-13. doi:10.1128/mBio.00775-13.

Chenal-Francisque, V., C. Charlier, S. Mehvish, H. Dieye, A. Leclercq, P. Courvalin, and M. Lecuit. 2014. **Highly Rifampin-Resistant *Listeria monocytogenes* Isolated from a Patient with Prosthetic Bone Infection.** Antimicrob Agents Chemother 58(3):1829-30.

5.3. CHAPITRES DE LIVRES

Charlier, C., and M. Lecuit. *Listériose*. Traité de Médecine. Edition Lavoisier 2014.

Charlier, C., and M. Lecuit. *Listériose*. Chapitre 67 Pilly Edition 2014 et 2015.

Le Monnier, A., Leclercq, A., and M. Lecuit. Chapitre *Listeria monocytogenes*. Remic 2015, Société Française de Microbiologie.

5.4. COMMUNICATIONS NATIONALES

Journées du Département Epidémiologie et Infections. 2014. C. Charlier, A. Leclercq, V. Goulet, O. Lortholary, P. Ravaud, M. Lecuit. Présentation orale et Poster. **Multicentric Observational National Analysis of Listeriosis and *Listeria*: MONALISA study.**

14^{ème} journée nationale d'infectiologie. 2014. Poster U-04. E. Gomes Pires, C. Reichert, O. Lortholary, M. Lecuit, C. Charlier. Présentation orale et Poster U-04. **Prise en charge des femmes enceintes dans un service de Maladies Infectieuses: Identification des difficultés et des axes d'amélioration.**

34^{ème} Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, Paris 27 Novembre 2014. C. Charlier. Présentation orale. **Résultats de l'Etude MONALISA.**

34^{ème} Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, Paris 27 Novembre 2014. P. Chatron, A. Leclercq, O. Lesens, P. Costis, T. Chatenet. Poster. **Infection ostéo-articulaire à *Listeria monocytogenes* : à propos d'un cas.**

Journée d'étude « Les techniques en microbiologie : de PETRI à MALDI-TOF » de l'Association des Responsables de la qualité et fiabilité analytique (Asfilab), Paris, 14 Novembre 2014. A. Leclercq. Présentation Orale. **Evolution des techniques : objectifs et bénéfiques.**

Club Qualité des Responsables qualité de l'Association Régionale des Industries Agro-alimentaires du Centre, Orléans, 25 septembre 2014. A. Leclercq. Présentation orale. **Le risque microbiologique dans l'alimentation. *Listeria monocytogenes* comme modèle.**

Conférence du Conseil scientifique de l'Institut Pasteur, Paris, 6/02/14. M. Lecuit. Présentation Orale. **Studying infections to better understand the biology of microbes and their hosts.**

5.5. COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

7th Global Microbial Identifier Meeting (GMI7), York, UK. 2014. Poster. Moura A., Pouseele H., Maury M., Touchon M., Chenal-Francisque V., Dieye H., Cantinelli T., Leclercq A., Jones L., Tarr C., Carleton H., Kucerova Z., Katz L., Stroika S., Larsson JT., Reimer A., Walker M., Nadon C., Nielsen E.M., Gerner-Smidt P., Pot B., Lecuit M., Brisse S. Poster. **Development of a core genome MLST scheme for global epidemiology and population biology of *Listeria monocytogenes*.**

24rd European congress of Clinical Microbiology and infectious diseases, Barcelone, 2014. Présentation orale. C. Charlier. **MONALISA Study: First results.**

Mini-Symposium on Neurotropism of *Listeria monocytogenes*, University of Bern, Bern, Suisse. Janvier 2014. Présentation orale. M. Lecuit. **Studying human neuroinfectious disease: an epidemiological, microbiological and experimental integrated approach.**

Mini-Symposium on Neurotropism of *Listeria monocytogenes*, University of Bern, Bern, Suisse. Janvier 2014. Présentation orale. S. Brisse. **The genetic structure of *Listeria monocytogenes* : phylogenetic and epidemiological perspectives.**

American Society for Cell Biology (ASCB) annual meeting, Philadelphia, PA / USA. 6-10/12/14. M. Lecuit. Présentation Orale. **Deciphering the molecular mechanisms of *Listeria* transcytosis across the intestinal epithelium in organoids.**

Microbes and Brain 1st internal symposium, Institut Pasteur. 26/11/14. M. Lecuit. Présentation Orale. **Microbes and Brain 1st internal symposium, Institut Pasteur, (2014) Nov 26**

Journée annuelle du Réseau des Cliniciens, Centre de Référence Déficits Immunitaires Héritaires (CEREDIH), Institut Imagine, Paris. 17/11/14. M. Lecuit. Présentation Orale. **Next Generation Sequencing-based pathogen discovery in immunodeficient patients.**

Department of Immunology Seminar series, Weizmann Institute, Israel. 18/11/14. M. Lecuit. Présentation Orale. ***Listeria* invasion of host tissues.**

Infect-ERA, Tel Aviv University, Israel. 16/11/14. M. Lecuit. Présentation Orale. **Proantilis kick-off meeting.**

France - Japan Immunology meeting, Cassis, France. 22-23/10/14. M. Lecuit. Présentation Orale. ***Listeria* invasion of host tissues.**

Seminars in Microbiology, Institute of Microbiology, ETH Zurich, Switzerland. 15/10/14. M. Lecuit. Présentation Orale. **How *Listeria* makes its way into the host.**

World Sepsis Day, Institut Pasteur, 12/09/14. M. Lecuit. Présentation Orale. **Interest of animal models.**

Program UE Europe “Microbial Evolution and Molecular Epidemiology”, Ecole Normale Supérieure, Lyon, France. 21/01/14. M. Lecuit. Présentation Orale. ***Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.**

PathoGenoMics/Infect-ERA meeting, Vienna, Austria. 19/03/14. M. Lecuit. Présentation Orale. **Analysis of the cellular mechanisms underlying the early response of the host to stress induced by *Listeria* infection (presentation of the results of the Listress program).**

PathoGenoMics/Infect-ERA meeting, Vienna, Austria. 20/03/14. M. Lecuit. Présentation Orale. **Subversive pro- and anti-inflammation signals promote infection by *Listeria monocytogenes* (presentation of the Proantilis program).**

24th Pasteur-Weizmann Symposium: Biological Communication, Institut Pasteur, Paris, France. 16-17/06/14. M. Lecuit. Présentation Orale. **How *Listeria* makes its way into the host.**

Berlin Life Science Colloquium, Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany. 04/09/14. M. Lecuit. Présentation Orale. **How *Listeria* makes its way into the host.**

Second meeting of Working Group on *Listeria monocytogenes* of the European Commission Mandate M381 of European validation of reference methods in Microbiology of the Food Chain, ANSES, European Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*, Maisons-Alfort. Février 2014. Présentation orale. A. Leclercq. **Taxonomy of *Listeria*: update, impact on methods validations and perspectives.**

5.6. CONFERENCES SUR INVITATIONS

Conférences décrites dans le chapitre 3.4.

5.7. PRESENCE DANS LES MEDIAS

Aucune sollicitation par les médias en 2014

6. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2015-2016

Outre la poursuite des activités de surveillance et d'expertise, le programme de travail plus spécifique du CNRL pour les années 2015-2016 est le suivant :

Typage et évolution des souches de *L. monocytogenes* :

- Mise au point d'une méthode de comparaison des souches de *L. monocytogenes* basée sur l'étude du core génome MLST (cgMLST) ;
- Evaluation de l'intérêt du séquençage complet du génome pour la surveillance nationale microbiologique, qui se fonde actuellement sur la PFGE ;
- Evaluation de la dynamique des clones et pulsotypes au sein des souches réceptionnées dans le cadre de la surveillance.

Aspects diagnostiques :

- Evaluations d'algorithmes diagnostiques cliniques grâce à l'étude MONALISA ;
- Evaluation des performances comparées des différents tests PCR et/ou sérologiques actuellement disponibles dans le diagnostic de listériose à partir des données clinico-biologiques obtenues grâce à l'étude MONALISA ;
- Evaluation de la virulence des souches de *Listeria monocytogenes*, et mise en évidence des caractéristiques génotypiques et phénotypiques différenciant les souches cliniques des souches environnementales notamment alimentaires.

Aspects thérapeutiques :

- Evaluation de l'antibiorésistance des *Lm*;
- Evaluation d'alternatives thérapeutiques dans le traitement de la listériose neuroméningée.

Aspects cliniques :

- Analyse et revue des données clinico-biologiques relatives aux souches d'origine humaine reçues au CNRL ;
- Analyse des données clinico-biologiques des cas de listérioses (MONALISA)

Aspects préventifs:

- Préciser les facteurs de risque de listériose (MONALISA)
- Etablir des recommandations ciblées pour les différentes populations à risque dont les personnes âgées

7. REFERENCES

1. Angelidis, A. S., M. S. Kalamaki, and S. S. Georgiadou. 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.
2. 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, Official Journal of the European Union.
3. Anonyme. 2012. European Manual of Clinical microbiology, 1st ed. SFM & ESCMID, Paris, France.
4. Anonyme. 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA, Parma, Italie. Accessible à <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/3991.htm>.
5. 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.
6. 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.
7. Aureli, P., G. C. Fiorucci, D. Caroli, G. Marchiaro, O. Novara, L. Leone, and S. Salmaso. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med* **342**:1236-41.
8. Charlier-Woerther, C., A. Leclercq, O. Lortholary, and M. Lecuit. 2009. [Listeriosis, a rare but severe foodborne infection]. *Rev Prat* **59**:905-11.
9. Charlier, C., C. Fevre, L. Travier, B. Cazenave, H. Bracq-Dieye, J. Podevin, D. Assomany, L. Guilbert, C. Bossard, F. Carpentier, V. Cales, A. Leclercq, and M. Lecuit. 2014. *Listeria monocytogenes*-associated biliary tract infections: a study of 12 consecutive cases and review. *Medicine (Baltimore)* **93**:e105.
10. Charlier, C., A. Leclercq, B. Cazenave, N. Desplaces, L. Travier, T. Cantinelli, O. Lortholary, V. Goulet, A. Le Monnier, and M. Lecuit. 2013. *Listeria monocytogenes*-associated joint and bone infections: a study of 43 consecutive cases. *Clin Infect Dis* **54**:240-8.
11. Chenal-Francisque, V., C. Charlier, S. Mehvish, H. Dieye, A. Leclercq, P. Courvalin, and M. Lecuit. 2014. Highly Rifampin-Resistant *Listeria monocytogenes* Isolated from a Patient with Prosthetic Bone Infection. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:1829-30.
12. Chenal-Francisque, V., J. Lopez, T. Cantinelli, V. Caro, C. Tran, A. Leclercq, M. Lecuit, and S. Brisse. 2011. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis* **17**:1110-2.
13. Cotter, P. D., L. A. Draper, E. M. Lawton, K. M. Daly, D. S. Groeger, P. G. Casey, R. P. Ross, and C. Hill. 2008. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* **4**:e1000144.
14. Dalton, C. B., C. C. Austin, J. Sobel, P. S. Hayes, W. F. Bibb, L. M. Graves, B. Swaminathan, M. E. Proctor, and P. M. Griffin. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med* **336**:100-5.
15. De Lappe, N., C. Lee, J. O'Connor, and M. Cormican. 2014. Misidentification of *Listeria monocytogenes* by the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol* **52**:3494-5.
16. de Noordhout, C. M., B. Devleeschauwer, F. J. Angulo, G. Verbeke, J. Haagsma, M. Kirk, A. Havelaar, and N. Speybroeck. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **14**:1073-82.
17. den Bakker, H. C., S. Warchocki, E. M. Wright, A. F. Allred, C. Ahlstrom, C. S. Manuel, M. J. Stasiewicz, A. Burrell, S. Roof, L. K. Strawn, E. Fortes, K. K. Nightingale, D. Kephart, and M. Wiedmann. 2014. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**:1882-9.
18. Disson, O., S. Grayo, E. Huillet, G. Nikitas, F. Langa-Vives, O. Dussurget, M. Ragon, A. Le Monnier, C. Babinet, P. Cossart, and M. Lecuit. 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* **455**:1114-8.

19. **Doumith, M., C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet, and P. Martin.** 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **42**:3819-22.
20. **FAO, and OMS.** 2002. Exemple de la cellule "Listeria", Conférence paneuropéenne sur la sécurité sanitaire et la qualité des aliments, document de séance de la délégation française, Budapest, Hongrie.
21. **Farfour, E., J. Leto, M. Barritault, C. Barberis, J. Meyer, B. Dauphin, A. S. Le Guern, A. Lefleche, E. Badell, N. Guiso, A. Leclercq, A. Le Monnier, M. Lecuit, V. Rodriguez-Nava, E. Bergeron, J. Raymond, S. Vimont, E. Bille, E. Carbonnelle, H. Guet-Revillet, H. Lecuyer, J. L. Beretti, C. Vay, P. Berche, A. Ferroni, X. Nassif, and O. Join-Lambert.** 2014. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J Clin Microbiol* **50**:2702-7.
22. **Gholizadeh, Y., C. Poyart, M. Juvin, J. L. Beretti, J. Croize, P. Berche, and J. L. Gaillard.** 1996. Serodiagnosis of listeriosis based upon detection of antibodies against recombinant truncated forms of listeriolysin O. *J Clin Microbiol* **34**:1391-5.
23. **Gilchrist, M.** 2009. Cutaneous *Listeria* infection. *Br J Hosp Med (Lond)* **70**:659.
24. **Girard, D., A. Leclercq, E. Laurent, M. Lecuit, H. de Valk, and V. Goulet.** 2014. Pregnancy-related listeriosis in France, 1984 to 2011, with a focus on 606 cases from 1999 to 2011. *Euro Surveill* **19**(38). pii: 20909
25. **Goulet, V., M. Hebert, C. Hedberg, E. Laurent, V. Vaillant, H. De Valk, and J. C. Desenclos.** 2012. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin Infect Dis* **54**:652-60.
26. **Goulet, V., C. Hedberg, A. Le Monnier, and H. de Valk.** 2008. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis* **14**:734-40.
27. **Goulet, V., L. A. King, V. Vaillant, and H. de Valk.** 2013. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis* **13**:11.
28. **Goulet, V., A. Leclercq, V. Vaillant, A. Le Monnier, E. Laurent, F. Thierry-Bled, N. Pihier, and H. De Valk.** 2008. Recrudescence récente des cas de listériose en France. *Bull. Epidemiol. Bebdom.* **30-31**:268-272.
29. **Goulet, V., Leclercq, A., Laurent E., King, L.A., Chenal-Francisque, V., Vaillant, V., Letort, M.J., Lecuit, M., H. de Valk.** . 2012. Surveillance de la listériose humaine en France, 1999-2011. . *Bull. Epidemiol. Bebdom. Hors Série.* **9 mai 2012.**: 38-40.
30. **Granier, S. A., C. Moubareck, C. Colaneri, A. Lemire, S. Roussel, T. T. Dao, P. Courvalin, and A. Brisabois.** 2011. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol* **77**:2788-90.
31. **Graves, L. M., and B. Swaminathan.** 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* **65**:55-62.
32. **Haase, J. K., X. Didelot, M. Lecuit, H. Korkeala, and M. Achtman.** 2013. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study. *Environ Microbiol* **16**:405-16.
33. **Haase, J. K., R. A. Murphy, K. R. Choudhury, and M. Achtman.** Revival of Seeliger's historical 'Special *Listeria* Culture Collection'. *Environ Microbiol* **13**:3163-71.
34. **Halpin, J. L., N. M. Garrett, E. M. Ribot, L. M. Graves, and K. L. Cooper.** 2010. Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog Dis* **7**:293-8.
35. **Hof, H.** 2013. Chemotherapy of *Listeria* infections. *GMS Infectious diseases* **1**:1-10.
36. **Ivanek, R., Y. T. Grohn, L. W. Tauer, and M. Wiedmann.** 2004. The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Crit Rev Food Sci Nutr* **44**:513-23.
37. **Jacquet, C., M. Doumith, J. I. Gordon, P. M. Martin, P. Cossart, and M. Lecuit.** 2004. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis* **189**:2094-100.
38. **Khen, B. K., O. A. Lynch, J. Carroll, D. A. McDowell, and G. Duffy.** 2014. Occurrence, Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* in the Beef Chain in the Republic of Ireland. *Zoonoses Public Health.*
39. **Le Monnier, A., E. Abachin, J. L. Beretti, P. Berche, and S. Kayal.** 2011. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis by real-time PCR for the hly gene. *J Clin Microbiol* **49**:3917-23.

40. Leclercq, A., C. Charlier, and M. Lecuit. 2015. Global burden of listeriosis: the tip of the iceberg. *Lancet Infect Dis* **14**:1027-8.
41. Leclercq, A., V. Chenal-Francisque, H. Dieye, T. Cantinelli, R. Drali, S. Brisse, and M. Lecuit. 2011. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. *Int J Food Microbiol* **147**:74-7.
42. Lecuit, M., D. M. Nelson, S. D. Smith, H. Khun, M. Huerre, M. C. Vacher-Lavenu, J. I. Gordon, and P. Cossart. 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.
43. Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet, and P. Cossart. 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* **292**:1722-5.
44. Morvan, A., C. Moubareck, A. Leclercq, M. Herve-Bazin, S. Bremont, M. Lecuit, P. Courvalin, and A. Le Monnier. 2010. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2728-31.
45. Muller, A., K. Rychli, M. Muhterem-Uyar, A. Zaiser, B. Stessl, C. M. Guinane, P. D. Cotter, M. Wagner, and S. Schmitz-Esser. 2013. Tn6188 - a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS One* **8**:e76835.
46. Ooi, S. T., and B. Lorber. 2005. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis* **40**:1327-32.
47. Ragon, M., T. Wirth, F. Hollandt, R. Lavenir, M. Lecuit, A. Le Monnier, and S. Brisse. 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog* **4**:e1000146.
48. Richard, S., C. Oggioni, C. Jacquet, E. Laurent, F. Lequerrec, N. Quelquejeu, and V. Goulet. 2004. Investigations autour de cas de listériose neuroméningée: bilan de 1è mois de fonctionnement. *Bull. Epidemiol. Hebdom.* **9**:35-36.
49. Roussel S., A. Leclercq, A. Santolini, A. Agbessi, V. Chenal-Francisque, R. Lailler, M. Lecuit, N. Pihier, and A. Brisabois. 2012. Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments. *Bull. Epidemiol. Hebdom. Hors série.* **9 mai 2012**:41-45.
50. Swaminathan, B., and P. Gerner-Smidt. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* **9**:1236-43.
51. Tourdjman, M., E. Laurent, and A. Leclercq. 2014. Listériose humaine : une zoonose d'origine alimentaire. *Revue Francophone des Laboratoires* **464**:37-44.

ANNEXE A. HISTORIQUE ET MISSIONS DU CNRL

A.1. HISTORIQUE

La Direction Générale de la Santé (DGS) a mis en place depuis 1982 une surveillance nationale de la listériose [En 2007, Swaminathan et Gerner-Smidt du CDC d'Atlanta ont signalé l'efficacité du modèle français de surveillance de la listériose (50)], avec le Centre National de Référence des *Listeria* localisé initialement 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.

Depuis juillet 1993, le Centre National de Référence des *Listeria* (CNRL) est hébergé à l'Institut Pasteur, initialement au sein du Laboratoire des *Listeria* puis depuis 2008 par le Groupe Microorganismes et Barrières de l'hôte devenu Unité de Biologie des Infections, Inserm U1117 en Janvier 2013. Il assure la surveillance microbiologique de la listériose en France. Son mandat de CNRL a été renouvelé par arrêté du 26 décembre 2011. L'Unité héberge également le Centre Collaborateur de l'OMS des *Listeria* (Mandat OMS renouvelé en Novembre 2011).

A.2. LES MISSIONS SPECIFIQUES DU CNRL

Les modalités de recrutement, les missions et le cahier des charges des CNR ont été fixés par l'arrêté du 29 Novembre 2004 (J.O n° 281 du 3 décembre 2004).

En termes d'expertises spécifiques dans son cahier des charges InVS pour le mandat 2012-2016, le CNRL doit :

- Typer en routine par une méthode discriminante basée sur le génotypage les souches humaines qui lui sont adressées ainsi que les souches alimentaires et/ou environnementales isolées lors d'investigations réalisées autour de cas de listériose humaine, et mettre en œuvre une nomenclature des souches fondée sur cette méthode.
- Disposer d'une expertise des méthodes diagnostiques utilisées en santé humaine comme la sérologie ou les méthodes moléculaires de diagnostic rapide, et contribuer au développement et à la validation de nouvelles méthodes diagnostiques utilisées en santé humaine.
- Etudier la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées chez l'homme, et surveiller l'apparition de souches de sensibilité diminuée aux antibiotiques. Contribuer à l'étude des nouveaux mécanismes de résistance en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques.
- Contribuer au développement des méthodes de typage et à la diffusion de ces techniques aux laboratoires d'analyse de biologie médicale.

En termes de surveillance, le CNRL doit :

- Surveiller toutes les souches issues d'infections humaines invasives ou non (GEA) de la manière la plus exhaustive possible, et détection des cas groupés.
- Etudier la sensibilité aux antibiotiques de ces souches isolées chez l'homme.
- Contribuer en liaison avec l'Institut de Veille Sanitaire à la surveillance épidémiologique nationale :
 - investigation notamment de cas groupés en comparant la souche humaine concernée aux souches isolées d'aliments et en donnant des informations sur la fréquence d'isolement de cette souche parmi les souches humaines isolées antérieurement.
 - signalement à l'Institut de Veille Sanitaire de cas groupés et de tout phénomène inhabituel : augmentation du nombre de cas (si dépassement d'un seuil défini en accord avec l'Institut de veille sanitaire), modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), apparition d'un nouveau phénotype de résistance, etc.

- Collaborer avec les structures (laboratoires, Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* (LNRI), ANSES-LSA etc.) travaillant en santé animale et sur les aliments (échange d'informations, de souches, etc.).
- Contribuer en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire aux systèmes de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE.

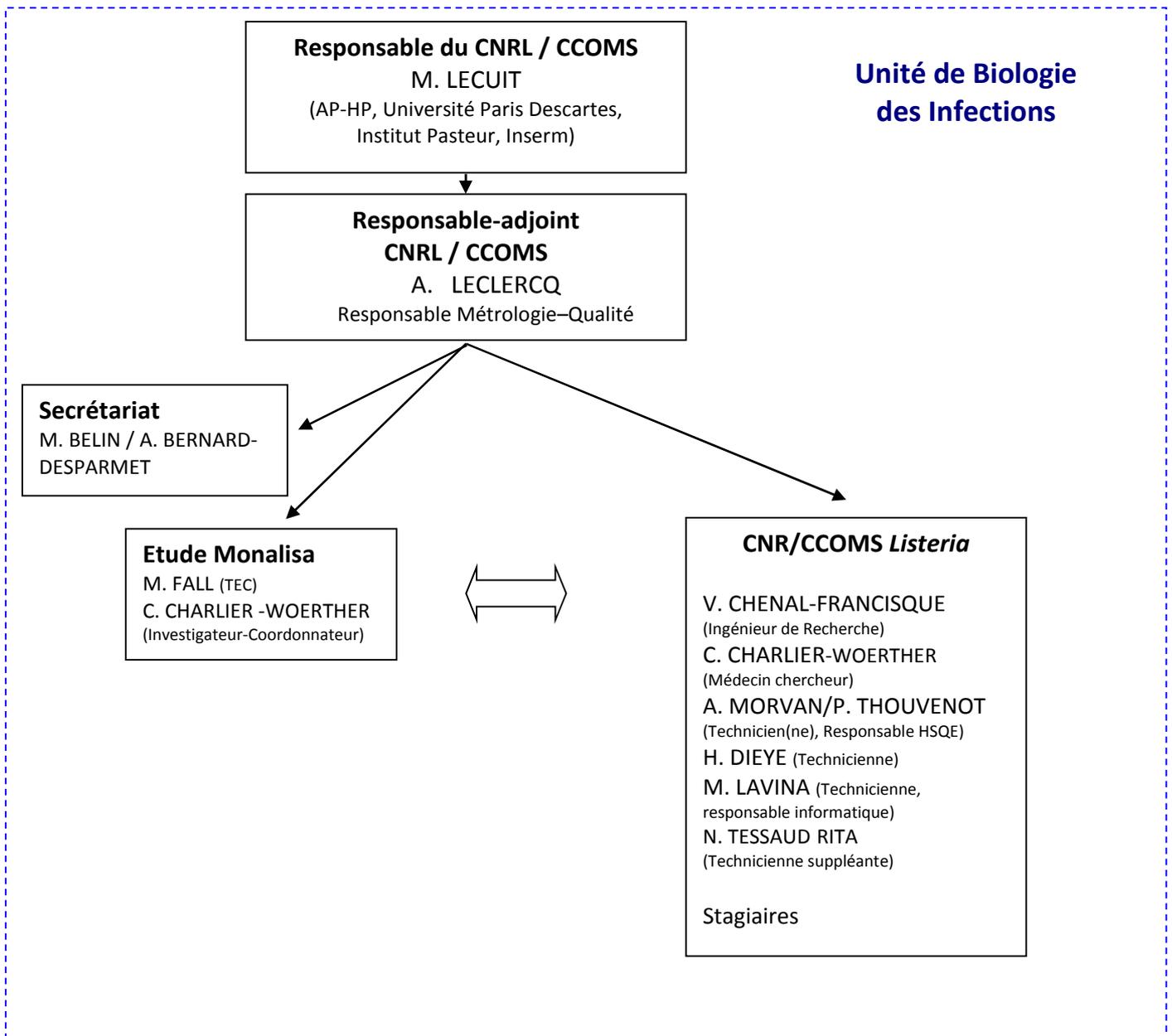
ANNEXE B : ORGANISATION DU CNR

B.1. PERSONNEL PERMANENT

Organigramme général et présentation

Il est présenté dans la figure 26.

Figure 26. Organigramme Général du Personnel du CNR *Listeria*.



Les effectifs

Ils sont présentés dans la Figure 26 et le Tableau 19.

Le responsable du CNRL est Marc Lecuit, professeur à l'Université Paris Descartes et praticien hospitalier à l'Hôpital Universitaire Necker Enfants malades, adjoint au chef du service des maladies infectieuses et tropicales (Centre d'infectiologie Necker-Pasteur). Il bénéficie d'un contrat d'interface Inserm pour hospitalier et dirige à l'Institut Pasteur l'Unité de Biologie des Infections, le CNRL et le CCOMS *Listeria*. Les responsables du CNRL possèdent respectivement une expertise médicale clinique et microbiologique (M. Lecuit) et une expertise en microbiologie et sécurité sanitaire des aliments (A. Leclercq). Caroline Charlier-Woerther, Médecin chercheur, participe, en s'appuyant sur l'analyse de l'ensemble des cas inclus de listériose dans le projet Monalisa, à l'expertise médicale.

Tableau 19. Personnel statutaire de l'Institut Pasteur affecté au CNR des *Listeria*

Nom - Prénom	Libellé Emploi	% Act*.	% Section Bud.**	Financement Quote-Part	ETP***
LECLERCQ Alexandre	Cadre A confirmé - Responsable-Adjoint	100,00	70,00	INVS	0,70
CHENAL FRANCISQUE Viviane	Ingénieur 2	100,00	100,00	INVS	0,30
Morgane LAVINA	Technicienne supérieure de laboratoire Échelle 5	100,00	90,00	INVS	0,80
Anne MORVAN	Technicien supérieur de laboratoire Échelle 6	100,00	90,00 (6 mois)	INVS	0,45
Pierre THOUVENOT	Technicien supérieur de laboratoire Échelle 5	100,00	100,00 (8 mois)	INVS	0,67
DIEYE Hélène	Technicienne supérieure de laboratoire Échelle 5	100,00	90,00	INVS	0,90
BELIN Martine	Secrétaire Échelle 4	50,00	50,00	IP	0,50
BERNARD- DESPARMET Alexandra	Secrétaire Échelle 4	25,00	25,00	IP	0,25
TOTAL Equivalent Temps Plein (ETP) (Hors responsable, OREX)					4,57

*% Act. : Il s'agit du contrat de travail, c'est-à-dire les personnes travaillent à l'IP à temps complet (100%) ou temps partiel (50, 60, 70, 80 ou 90%).

**% Section Bud. Il s'agit du pourcentage de leur temps de travail affecté à l'activité CNR

***ETP : Equivalent Temps Plein.

Anne MORVAN, technicienne de laboratoire a quitté le laboratoire (Départ en retraite) et a été remplacée par Pierre THOUVENOT le 22 Avril 2014.

Martine BELIN, secrétaire, a quitté le laboratoire (mobilité interne) et a été remplacée le 16 Juillet 2014 par Alexandra BERNARD-DESPARMET.

Pour le reste de son activité, le personnel du CNR listé dans le Tableau 19 est financé par l'Institut Pasteur.

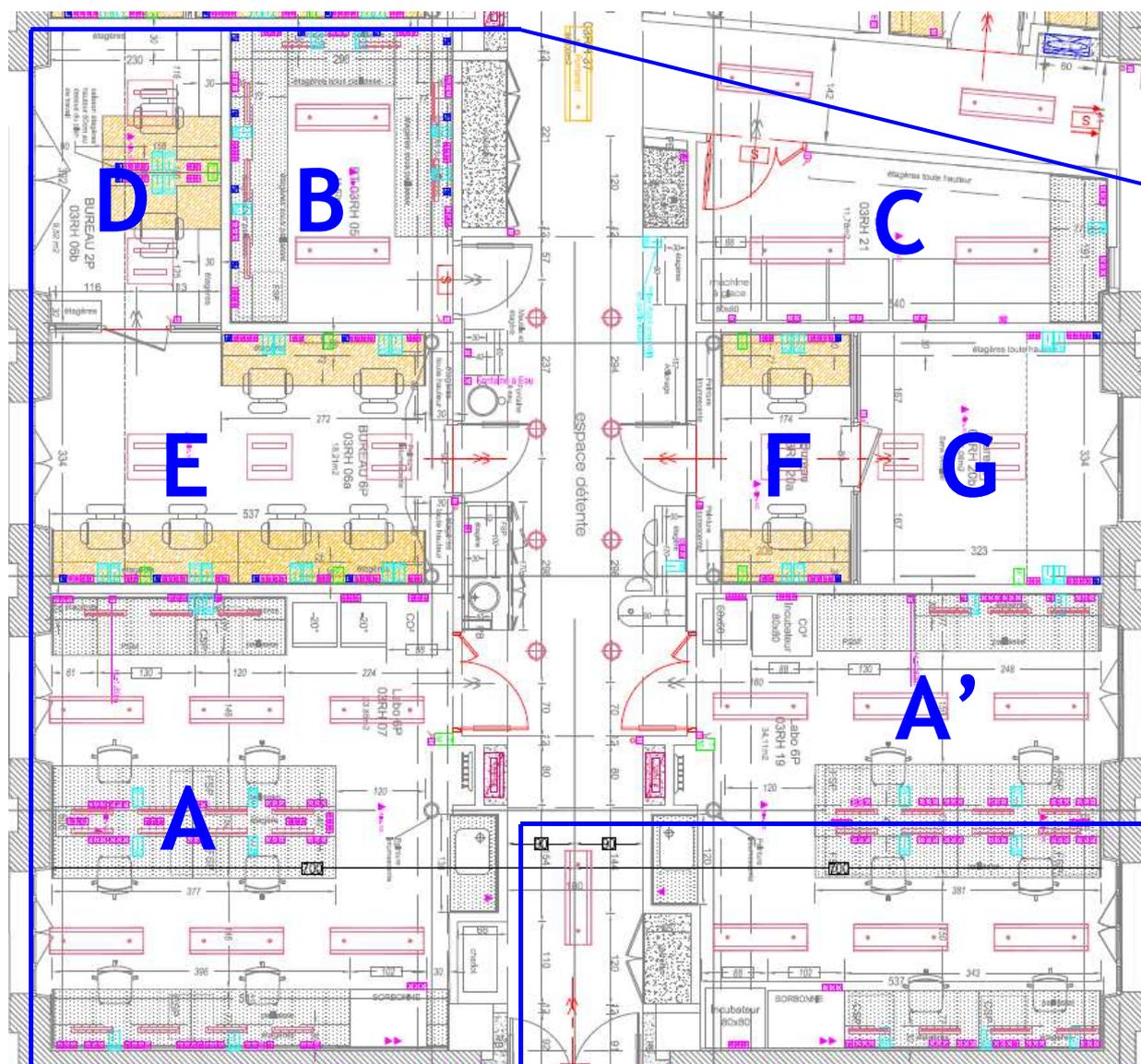
B.2. LOCAUX

Laboratoires et bureaux:

Le CNRL est hébergé dans des locaux entièrement rénovés, 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 27 hébergent le CNRL et le Centre collaborateur de l'OMS *Listeria* (CCOMS).

Figure 27. Plan des locaux du CNR des *Listeria*



Locaux du CNRL (Figure 27) :

- 1 pièce laboratoire dédiée (A) et accès à un laboratoire de recherche (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

B.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 [10% de son budget de fonctionnement].

En 2014, l'Institut Pasteur a financé l'acquisition de deux réfrigérateurs de qualité biologie biomédicale dans le cadre de l'accréditation du CNRL.

Matériel, équipements utilisés

- Matériel courant d'un laboratoire règlementaire de confinement L2 de microbiologie classique et de biologie moléculaire,
- 1 poste de sécurité microbiologique,
- 2 étuves,
- 3 bains thermostatés humides et 3 bains thermostatés à sec,
- 1 four à hybridation,
- 5 réfrigérateurs,
- 2 congélateurs,
- 1 congélateur -80 °C,
- 1 centrifugeuse dont une pour les plaques,
- 3 équipements d'électrophorèse en champs pulsé partagés avec d'autres CNR,
- 3 thermocycleurs en point final,
- 2 générateurs et cuves d'électrophorèse,
- 1 fax-copieur.

Equipements partagés avec d'autres CNR

- 2 balances 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,
- 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 la société PCO 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 4 ans.

Moyens extérieurs à la structure / Structures Transversales

- Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence : Accès à un appareil de PCR en temps réel,
- Génopole Plateforme PF1 séquençage,
- Animaleries de l'Institut Pasteur.

B.4. Mise en place de la démarche de management de la Qualité et hygiène/sécurité au sein du CNRL

Le CNRL est engagé depuis de nombreuses années dans une démarche qualité à laquelle participent tous les acteurs du laboratoire. Les modes opératoires sont suivis et mis à jour régulièrement pour accompagner les changements adoptés dans les domaines de notre expertise.

Le CNRL est engagé à une conformité par rapport au référentiel NF EN ISO 15189, et a finalisé en 2014 l'adaptation de son système qualité à ce nouveau référentiel et aux documents de référence du COFRAC en santé humaine.

Intégration du CNRL dans le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) et démarche qualité du LREMS: synthèse 2014

Historique :

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le référentiel GBEA et, depuis 2008, dans le cadre des inspections ANSM, les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Projet ISO 15189 du LREMS de l'Institut Pasteur :

Bilan des actions réalisées en 2014 :

- Groupe de Travail Technique pour les validations de méthode (biologie moléculaire et sérologie) ;
- Mise à jour du manuel qualité (V2)
- Formations : WebCampus, Manuel Qualité LREMS et Kalilab ;
- Audits internes techniques ISO 15189 pour les sites concernés par l'audit ISO 15189 ;
- Revue de direction LREMS ;
- Inclusion de la vague 3 (CNR des anaérobies, CNR *Yersinia*, CNR mycose et antifongique, CNR *Listeria*, CNR Méningocoques, CNR *E. coli*) dans la démarche d'accréditation ISO 15189.

Evènements d'importance en 2014 :

- Audit ISO 15189 du LREMS accrédité par le COFRAC reporté à Janvier 2015

Perspectives 2015 :

- Audits internes qualité et technique ISO 15189 : Mars à Mai 2015
- Revue de direction LREMS : Mai 2015
- Finalisation dossiers de validation de méthode (3^{ème}vague) : mars 2015
- Audit de suivi ISO 15189 version 2012 avec extension du périmètre (nouvelles techniques et nouveaux sites) : Juin 2015

Programme concernant le CNR des *Listeria* faisant partie de la 3^{ème} vague d'accréditation

1. Revues qualité LRE-MS du CNR *Listeria* : 06 Mars 2014
2. Revue de direction LRE-MS : 8 Avril 2014
3. Finalisation dossier de validation de méthode: Octobre 2014
4. Audit interne CNR *Listeria* : Octobre 2014
5. Audit COFRAC LRE-MS: Janvier 2015
6. Envoi du dossier de validation de méthode dossier de validation de méthode Groupage PCR : Mars 2015
7. Evaluation COFRAC LRE-MS dont CNR *Listeria* (Méthode Groupage PCR) : Juin 2015

8. Extension de la portée d'accréditation (Méthodes Identification, PFGE *Ascl/Apal* et antibiogramme) : 2016

13. Extension de la portée d'accréditation (Méthodes Sérotypage classique et MLST) : 2017

Tableau 20. Liste des méthodes soumises à l'accréditation et volume d'activité annuelle (%)

Méthodes analytiques	% Activité	Année prévue de soumission à l'accréditation
Identification de <i>Listeria monocytogenes</i>	100%	2016
Sérotypage par agglutination de <i>Listeria monocytogenes</i>	1%	2016
Génosérotypage de <i>Listeria monocytogenes</i>	100%	2015
Typage moléculaire PFGE de <i>Listeria monocytogenes</i>	95%	2016
Détermination de la sensibilité de <i>Listeria monocytogenes</i> aux agents antimicrobiens (Méthode EUCAST)	20%	2016

Le calendrier des méthodes demandées à l'accréditation (Tableau 20) a été réalisé en tenant compte de la possibilité que le séquençage de génome rende caduque des méthodes classiques.

Essais d'intercomparaison (EQA) de l'ECDC

Le CNRL participe à l'essai d'intercomparaison (EQA) entre les CNR européens organisés par le Statens Serum Institute (Danemark) pour l'ECDC. Une campagne de CIL a eu lieu en Septembre 2014 sur le sérotypage classique, le génosérotypage et la PFGE avec les enzymes *Ascl/Apal*. Le CNR *Listeria* a obtenu le résultat présenté dans le Tableau 21 ainsi que le certificat attendant de réussite pour cet EQA.

Cet essai a été réalisé comme un échantillon primaire de routine par Pierre THOUVENOT, technicien arrivé au CNRL en Avril 2014, pour montrer la robustesse des méthodes du CNRL sur l'aspect personnel.

Tableau 21. Résultats du CNR des *Listeria* à l'essai d'intercomparaison (EQA) de l'ECDC de 2014

Campagne EQA (Date)		EQA N° 3 (Octobre 2014)
Nombre de laboratoires participants		18
Nombre de souches testées		11
Identification <i>Lm</i>		Conforme
Scores sérotypage classique		Conforme
Scores sérotypage moléculaire		Conforme
Qualité Gel PFGE	<i>Ascl</i>	Conforme
	<i>Apal</i>	
Analyse gel PFGE Bionumerics		Conforme

Enquête satisfaction client 2014

En 2014, le CNRL a envoyé à 272 laboratoires correspondants (81% LABM et 19% de Microbiologie Alimentaire) une enquête de satisfaction clients. 73 (27%) laboratoires ont répondu avec une note moyenne pour les différents points décrits dans le tableau 22 entre 3 et 3,5 sur 4 (Très bien). Les raisons d'utilisation du CNRL est d'abord son support technique et conseils (54%) et un choix imposé (41%). Les principaux axes d'amélioration suggérés sont : un délai de rendu de résultats plus courts et des résultats disponibles par voie dématérialisée via internet. Lors de cette enquête, le site web du CNRL était sous son ancienne version.

Tableau 22. Résultats de l'enquête satisfaction client 2014

Question Posée	Note moyenne sur 4
1. Activités analytiques	
1.1 - Méthodes réalisées	3,4
1.2 - Conditions générales analytiques sur notre site Web	3,2
1.3 - Contenu du compte-rendu d'analyses	3,5
1.4 - Délai de rendu de résultats	3,0
2. Relations	
2.1 - Accueil téléphonique	3,4
2.2 - Disponibilité des interlocuteurs	3,4
2.3 - Qualité des réponses données	3,5
2.4 - Traitement de vos réclamations	3,4
3. Site Web	
3.1 - Présentation	3,3
3.2 - Intérêt des informations données	3,3
3.3 - Convivialité du site web	3,1
4. Compte-rendu diffusé	
4.1 - Respect des délais de rendu des résultats	3,1
4.2 - Présentation et clarté du compte rendu	3,4
4.3 - Les moyens de transmission des résultats	3,0
4.4 - Interprétations des résultats et commentaires oraux des responsables du CNR	3,4
4.5 - Conformité des analyses réalisées avec votre demande	3,5
5. La présentation générale	
5.1. - Etes-vous satisfait de la prestation de conseil assurée par les Responsables ?	3,5

Hygiène/Sécurité

Outre cette démarche qualité, le CNRL comptabilise dans son personnel le responsable hygiène et sécurité d'un des sites de l'Institut Pasteur. Ce personnel veille au respect quotidien des réglementations en termes d'hygiène, de biosécurité et de biosûreté au sein du CNRL.

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

C.1. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE *L. MONOCYTOGENES* : METHODES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES

Les souches reçues font systématiquement l'objet des analyses suivantes:

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

- **Confirmation de l'identification du genre et de l'espèce** par microscopie et coloration de Gram, tests biochimiques [galerie API-*Listeria*® (bioMérieux, France)] et recherche du caractère hémolytique. Les souches atypiques ou rendues non *Listeria* spp. sont soumises à une identification moléculaire par séquençage sur environ 1400 pb du gène codant les ARNr 16S et du gène *iap* (MLSA (MultiLocus Sequence Analysis) d'identification).

- **Détermination du sérotype PCR** selon la méthode publiée par le CNRL par M. Doumith (19) en 2004 et amendé par A. Leclercq en 2011 (41). Elle a remplacé la méthode classique de sérotypage depuis le 01/03/05. 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 la culture sur gélose nutritive de la souche envoyée par le correspondant. Le CNR continue de détenir l'ensemble des souches commerciales O et H et de référence OMS pour réaliser sur demande le sérotypage classique des *Listeria* spp.

- **Analyse des profils de macrorestriction d'ADN génomique** (PFGE : électrophorèse en champ pulsé) obtenus au moyen du système d'électrophorèse CHEF et des enzymes de restriction *Ascl* et *Apal* selon le protocole international standardisé du CDC d'Atlanta et des réseaux PulseNet décrit par Graves *et coll.* en 2001 (31) et modifié en 2013. Une troisième enzyme *SmaI* peut être utilisée selon la méthode interne développée par le CNRL afin d'augmenter le pouvoir discriminant de la PFGE. Ce 3^{ème} enzyme sert à différencier des profils très proches avec les enzymes *Ascl*/*Apal* (1 ou 2 bandes de différences) pour leur attribuer un numéro correct de nomenclature et les relier éventuellement à un dépassement de seuil ou une alerte.

A ce stade un numéro de nomenclature est attribué à chaque souche.

La nomenclature actuelle (définie en 2010 et modifiée en 2012) est la suivante : identifiant unique regroupant l'espèce (M = *monocytogenes*, I = *innocua*, IV = *ivanovii*, S = *seeligeri*, W = *welshimeri*, G = *grayi*, R = *rocourtiae*, Mi = *marthii*, We = *weihenstephanensis*, Fl = *fleischmannii*, A = *aquatica*, FL = *floridensis*, CO = *cornellensis*, GR = *grandensis*, et RI = *riparia*), le groupe PCR et le profil combiné PFGE *Ascl*/*Apal* et éventuellement *SmaI*, quand il a été déterminé. Par exemple, la souche M-Ilc-301006/301006 /B est une souche de *Listeria monocytogenes* de groupe PCR Ilc de profil PFGE *Ascl* 301006, de profil PFGE *Apal* 301006 et de profil *SmaI* B.

Un dictionnaire entre les profils PFGE et les allèles MLST a été finalisé en 2014 et la correspondance établie à chaque surveillance hebdomadaire.

- **Antibiogramme** de toutes les souches d'origine humaine en utilisant la technique de dilution en milieu gélosé selon les nouvelles recommandations de l'EUCAST. Ces antibiogrammes sont effectués sur un panel de 23 antibiotiques incluant notamment de nouvelles molécules récemment commercialisées et/ou non testées auparavant. La résistance des souches détectées est authentifiée par la détermination de la CMI par E-test. Les souches résistantes aux antibiotiques sont transférées au CNR de la Résistance aux Antibiotiques pour confirmation et étude approfondie du mécanisme de résistance.

Des analyses complémentaires peuvent également être effectuées, dans le cadre de projets de recherche ou pour approfondir une investigation dans le cadre de la surveillance nationale:

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

- **Analyse génétique des souches.** Sur la base du schéma MLST que le CNRL a établi et reconnu maintenant internationalement pour l'étude des populations de *L. monocytogenes*, les souches d'intérêt de *Lm* peuvent être typées et leur appartenance à un complexe clonal déterminée rapidement. Ce typage permet de les positionner par rapport aux complexes clonaux qui ont déjà été à l'origine d'épidémies ou de cas groupés et de détecter une évolution des souches.

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

- **Séquençage du génome des souches** en collaboration avec la plate-forme PF1 ou sous-traité à un laboratoire accrédité NF EN ISO 17025.

- **Etude de la troncation de la protéine InIA** par séquençage et IFI pour estimer la virulence de la souche et sa capacité à traverser la barrière intestinale.

[C.2. Techniques développées ou à l'étude en 2014](#)

Méthodes en développement

Développement d'un outil de typage moléculaire des *Listeria monocytogenes* permettant d'estimer le potentiel de virulence des souches.

Personnes impliquées au CNRL : V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, M. Lecuit

En collaboration avec M. Maury et S. Brisse (Unité de Génomique évolutive des Microbes)

*Article publié : Chenal-Francisque, V., Maury, M. M., Lavina, M., Touchon, M., Leclercq, A., Lecuit, M., Brisse, S. 2015. Clonogrouping, a rapid multiplex PCR method to identify major clones of *Listeria monocytogenes*. J. Clin. Microb. In press. DOI. 10.1128/JCM.00738-15*

Brevet en cours de dépôt.

*Abstract : Three multiplex PCR assays were developed to identify the eleven most common *Listeria monocytogenes* clones in clinical and food samples. 270 of 282 (95.7%) strains of serogroups IVb, IIb, IIa and IIc were identified accurately. This novel tool is a rapid and efficient alternative to MLST for identification of *L. monocytogenes* clones.*

Méthodes en cours de validation

Typage moléculaire par core genome MLST (cgMLST)

Personnes impliquées au CNRL : A. Moura - V. Chenal-Francisque - A. Leclercq - M. Lecuit

En collaboration avec Sylvain Brisse, Unité de génomique évolutive des microbes, Institut Pasteur.

Présenté en poster à 7th Global Microbial Identifier Meeting (GMI7), York, UK. 2014.

Abstract GMI7: Listeria monocytogenes (Lm) is an important foodborne pathogen. In the last decades, *Lm* outbreaks have been reported worldwide, causing numerous deaths and reinforcing the need for discriminatory typing methods for surveillance and outbreak investigations. Here we report on our ongoing efforts to develop a core genome multi-locus sequencing typing (cgMLST) typing scheme for *Lm*. The proposed scheme was developed based on 104 genomic sequences of strains of the 4 major phylogenetic lineages and representative of the clonal diversity within lineages I and II. The *Lm* cgMLST scheme consists of a universal set of loci which have been quality-checked using BioNumerics v7.5 procedures (Applied Maths, Belgium) and implemented online in a BIGSdb database. The *Lm* cgMLST scheme is proposed for international collaboration on research and surveillance of *L. monocytogenes*.

Evaluation des kits de sérodiagnostic et de PCR

L'évaluation des kits de sérodiagnostic de la listériose utilisés notamment dans le cadre du diagnostic de l'infection de la femme enceinte et des kits de PCR dans le cadre du diagnostic des formes neuroméningées est nécessaire, et pourrait conduire à inclure les cas d'infections neuroméningées au cours desquels *L. monocytogenes* ne serait pas isolée, mais la PCR serait positive.

Le CNRL n'est pas un laboratoire d'analyse de biologie médicale et ne reçoit donc pas actuellement de prélèvements biologiques humains dans un objectif de diagnostic de première intention. En conséquence, il ne dispose pas à ce jour d'échantillons biologiques issus de cas ou de témoins pour évaluer la qualité et les performances de ces kits et préciser leur intérêt dans la démarche diagnostique.

Le CNRL a mis en place l'étude MONALISA afin, notamment, de recueillir les échantillons biologiques issus de patients avec listériose invasive et de patients témoins, et a constitué une bibliothèque permettant d'évaluer ces outils diagnostiques dans un second temps, si un financement spécifique peut être obtenu.

C.3. MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE

Les souches bactériennes et les collections

Il existe 8 catégories de souches envoyées au CNRL :

1. **souches humaines** : souches cliniques
2. **alerte sanitaire** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de ces aliments, isolées dans le cadre d'investigation de cas groupés ou épidémiques 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 ces aliments isolées dans le cadre de contrôles officiels ou autocontrôles faisant l'objet d'une alerte DGAL avec saisie, ou retrait, ou rappel de produit. Ces « alertes-produits » correspondent soit à des non-conformités aux critères réglementaires fixés pour les aliments (présence de *L. monocytogenes* ou dépassement du seuil de 100 *L. monocytogenes*/g-ml), soit à des situations considérées par la DGAL comme une menace 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 décrit 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, LVD, laboratoires privés d'hygiène et de contrôle, etc.). Ces interlocuteurs peuvent exiger la confidentialité de l'information transmise vis-à-vis des autorités sanitaires, ce qui limite l'exhaustivité de l'information recueillie.
6. **santé animale** : souches transmises par les laboratoires vétérinaires départementaux (LVD) dans le cadre de la santé animale.
7. **études et projets de recherche** : souches isolées lors d'enquêtes, études et recherches, sur un type de produit, une filière, etc.
8. **environnement** : Les souches environnementales (origines hydriques, 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) très importante, véritable Centre de Ressource Biologique, utile dans le cas d'une investigation d'un clone épidémique pour identifier son origine géographique,

temporelle ou sa source.

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

Les collections de souches du CNRL/CCOMS sont les suivantes :

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

Le CNRL dispose des souches types complètement caractérisées des 17 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. rocourtiaae*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii*, *L. fleischmannii* subsp. *colorendiensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria cornellensis*, *Listeria riparia*, *Listeria grandensis*, *Listeria booriae*, *Listeria newyorkensis*) ainsi que des 15 souches de référence pour la sérotypie. En 2014, le CNR a actualisé sa collection avec 5 nouvelles espèces et est en cours de collection des deux dernières espèces *Listeria booriae* et *Listeria newyorkensis*. Ces souches sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée et à -80°C en tube de cryo-billes dans un congélateur sous alarme permanente.

Collection de Listeria de l'Institut Pasteur (CLIP)

Chaque année, la collection du CNRL et du CCOMS s'incrémente d'environ 1.600 souches caractérisées par phénotypie, génosérotypage, PFGE, et, pour certaines, MLST et génome. Une base de données Excel regroupe l'ensemble des données sur ces souches.

Cette collection, majoritairement française, mais également internationale (CCOMS) comportait 103 949 souches à la fin de l'année 2014. Ces souches sont d'origine clinique, alimentaire et environnementale, ainsi que vétérinaire ou de recherche. Environ 62 765 souches de cette collection proviennent du CNRL. Elles sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée. Les souches d'origine humaine sont conservées à -80°C en tube de cryobilles dans un congélateur 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* du Professeur H.P.R. Seeliger (Würzburg, Allemagne) qui comporte plus de 5.000 souches isolées entre 1926 et 1985. L'intérêt de cette collection léguée au CCOMS des *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* (32, 33). 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 EN ISO 9001) 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* 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 : http://catalogue.crbip.pasteur.fr/crbip_catalogue/faces/recherche_catalogue.xhtml et elles sont disponibles moyennant une somme couvrant les frais d'envoi et de maintien en collection sous

assurance qualité.

Les sérums anti-facteurs

Le CNRL produisait les 13 sérums contre les antigènes somatiques de *Listeria*, et si nécessaire les 5 sérums anti-flagellaires, utilisés pour la caractérisation antigénique des souches de *L. monocytogenes* et des autres espèces de *Listeria*. Depuis l'abandon de la sérotypie au profit du groupage par PCR multiplex (Doumith et coll., 2004), la production en routine de ces sérums a été arrêtée, mais un stock minimum a été maintenu. Le CNRL détient également l'ensemble des sera Denka Seiken (japon) commerciaux de sérotypage des *Lm*.

Les bactériophages

Le CNRL possède la collection de bactériophages de lysotypie du Centre International de Lysotypie des *Listeria* (1982-1992 ; Institut Pasteur, Paris). Cette collection présente un intérêt du fait des nouveaux outils diagnostiques 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.

C.4. DIFFUSION ET ECHANGE DE MATERIEL BIOLOGIQUE

Outre des souches, le CNRL propose aux équipes de recherche collaborant avec lui de diffuser des extraits purifiés d'ADN de souches de référence et des souches de collection.

En 2014, le CNRL a envoyé 1 souche et 2 ADN de souches de la collection du CNRL :

- 1 souche *Lm* pour une étude de MLST (G.M. Knudsen and L. Gram, Department of system biology, technical University of Denmark, Danemark);
- 2 ADN de *Lm* dans le cadre de l'épidémie danoise (E. Moller Nielsen, Statens Serum institute, Danemark).

En 2014, le CNR a réceptionné 16 souches *Lm*:

- 5 souches des nouvelles espèces de *Listeria* (M. Wiedmann, Cornell University, Food Science Department, USA) ;
- 11 souches dans le cadre de l'essai d'intercomparaison des CNRL (EQA) en Octobre 2014 de l'ECDC (Statens Serum institute, Copenhague).

Conditions de mise à disposition de ces collections

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité des CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigé pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place à minima d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement - MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties.

Suivant le statut industriel ou académique du partenaire et la nature de l'accord, cette mise à disposition donne éventuellement lieu à une contrepartie financière.

Maintien et curation de bases de données

Suite à la publication d'une méthode MLST (12, 47), l'Institut Pasteur a mis en place une base de données de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) ouverte et accessible en ligne à la communauté scientifique <http://www2.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/> afin de favoriser les échanges et les collaborations internationales sur l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria*. Plusieurs groupes (USA, Europe) utilisent cette base de données et des travaux collaboratifs dans le domaine de l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria* sont en cours.

De même, dans le cadre de son développement de la méthode cgMLST de génomique, le CNRL en partenariat avec S. Brisse (Institut Pasteur) a mis en place cet outil et une base de données accessible en ligne à la communauté scientifique selon des règles d'utilisation définies <http://bigsdbs.web.pasteur.fr/Listeria>.

C.5. TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL

En microbiologie clinique

Le CNRL recommande de suivre les recommandations de l'European Manual of Clinical Microbiology / REMIC européen, chapitre *Listeria* (3).

Par ailleurs, 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 actuellement 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 (Pasteur Cerba ou Biomnis) pour les demandes de sérologie.

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

Hémoculture : milieux commerciaux classiques

LCR : Bouillon nutritif glucosé à 0,5%

Selles : isolement sur gélose ALOA™ ou géloses équivalentes

Autres prélèvements : Gélose nutritive ordinaire ou à 5% de sang frais, supplémentée ou non en acide nalidixique et colistine (Gélose ANC)

- *Identification*

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). 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*.

L'identification par MALDI-TOF est correcte au genre, mais que cette méthode ne permet pas une bonne identification à l'espèce (21).

- *Sérotypage*

Le CNRL ne recommande pas aux laboratoires de 1^{ère} intention d'effectuer le sérotypage sauf pour les sérovars 1/2a, 1/2b, 1/2c et 4b avec le kit de sérotypage de la firme DENKA SEIKEN (Japon) étant donné la faible performance des antisera dans ce kit selon les lots. En outre, ce kit ne contient que 9 sérums des antifacteurs O sur les 15 à utiliser pour sérotyper les *Listeria*. Les autres kits commerciaux n'ont pas été évalués ou soumis à validation par le fournisseur auprès du CNRL.

- *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).

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 v5.0 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 M45A2 du CLSI. Les concentrations minimales inhibitrices et les diamètres sont en cours d'établissement.

A la demande de nombreux laboratoires correspondants, nous proposons le Tableau 23 suivant d'interprétation des résultats d'antibiogrammes. Les figures 26 à 29 présentent les différents résultats du CNRL pour les antibiogrammes des souches humaines de 2014 envers les antibiotiques : Amoxicilline, Ampicilline, Gentamicine, Triméthoprime.

Tableau 23. Valeurs de référence pour l'interprétation des antibiogrammes pour *Listeria monocytogenes* (* selon le CLSI M45A2 et ** selon l'EU-CAST version 5.0 page 67 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
Gentamicine*	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacine*	≤ 1	2	≥ 4
Chloramphenicol*	≤ 8	16	≥ 32
Streptomycine*	≤ 8	> 8 - ≤ 16	> 16
Vancomycine*	≤ 4	8-16	≥ 32
Erythromycine**	≤ 1	-	> 1
Tétracycline*	≤ 4	8	≥ 16
Triméthoprime +Sulfaméthoxazole**	≤ 0.06	-	> 0.06

- *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. Les résultats de ce sérodiagnostic décrit dans le REMIC (Sérodiagnostic de la listériose, chapitre 37) ne sont pas pris en compte dans la surveillance nationale (3) et ne seront plus recommandés dans la version 2015 du REMIC.

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 (22). 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). Des titres d'anticorps agglutinants de 1/320 à 1/640 au-delà de 10 jours d'infection sont constatés.
- 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.

- *PCR en point final ou temps réel sur LCR*

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 *L. monocytogenes* disponibles. Il semble néanmoins pour les PCR sur LCR qu'une qPCR spécifique *L. monocytogenes* (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.

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

- Gamme RealArt artus (PCR en temps réel) pour *L. monocytogenes* sur l'automate Lightcycler (QIAGEN),
- Taqman® *Listeria monocytogenes* detection kit (APPLIED BIOSYSTEMS)
- La méthode de PCR temps réel sur le gène *hly* développée par le CNRL et le service de microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants Malades pour *L. monocytogenes* (39).

En microbiologie vétérinaire

Le CNRL recommande de suivre les instructions de l'Office International des Epizooties téléchargeables à l'adresse :

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf

En microbiologie des aliments

Conformément aux règlements européens EC 2073/2005 modifiés, le CNRL recommande en France de suivre la norme de référence pour les prélèvements de l'environnement NF ISO 18593 : 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 et amendement 1: Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* - Partie 1 : méthode de recherche ;
- NF EN ISO 11290-2 et amendement 1: Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* -

Les méthodes alternatives validées selon l'EN ISO 16140 par AFNOR certification et par Microval (Tableaux 24 et 25) sont actualisées et disponibles sur les sites respectifs : <http://www.afnor-validation.org/afnor-validation-agroalimentaire/agroalimentaire.html> et <http://www.microval.org/validated-methods-Lm.html>.

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) (15) 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).

Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNRL a transféré en 2014 sa méthode de typage MLST et PFGE *Sma*I à des laboratoires français ou étrangers souhaitant utiliser ces techniques.

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

L'ensemble des données épidémioclinico-microbiologiques collectées pour chaque souche est rassemblé dans le Système Informatique du Laboratoire (SIL) du CNRL. Ce SIL 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 mis à jour sa déclaration de cette base de données de LAGON 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. Outre la gestion en temps réel des échantillons (suivi administratif, enregistrements des résultats techniques, etc.), le logiciel LAGON® permet l'anonymisation des données, leur archivage et une meilleure traçabilité. Les principaux axes de

développement à effectuer sont : développement d'un module d'envoi d'un accusé de réception des envois aux laboratoires expéditeurs, le développement de l'informatisation de la surveillance ainsi que de transferts de données et la compatibilité de LAGON® avec le système de surveillance européen TESSY.

Gestion des données de caractérisation/typage des souches : Logiciel Bionumerics 6.6® (Applied Maths)

Le CNRL possède une base de données des profils de macrorestriction des souches réceptionnées au CNRL depuis 2005 qui comporte outre les 16.250 profils de macrorestriction, 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. Grâce à cette base de données, le CNRL a partiellement informatisé la comparaison des profils qui nécessite cependant toujours des comparaisons à l'œil nu pour interpréter certains résultats et lui permet d'attribuer avec fiabilité un numéro de nomenclature, en conformité avec son cahier des charges.

En 2015, le CNRL passera à la version 7.5.

Management de la qualité : Kalilab® et WebCampus

Le CNRL utilise un logiciel de management de la qualité Kalilab® pour gérer les anomalies et les réclamations clients. Le logiciel Webcampus de gestion documentaire dématérialise le système documentaire du management de la qualité du CNRL pour en assurer un suivi efficace et actualisé.

ANNEXE D : LISTE COMPLEMENTAIRE DES PUBLICATIONS 2014 DE L'UNITE DE BIOLOGIE DES INFECTIONS

Aguilar C, Malphettes M, Donadieu J, Chandesris O, Coignard-Biehler H, Catherinot E, Pellier I, Stephan JL, Le Moing V, Barlogis V, Suarez F, Gérart S, Lanternier F, Jaccard A, Consigny PH, Moulin F, Launay O, Lecuit M, Hermine O, Oksenhendler E, Picard C, Blanche S, Fischer A, Mahlaoui N, Lortholary O. Prevention of infections during primary immunodeficiency. *Clin Infect Dis*. 2014 Nov 15; 59(10):1462-70.

Bécavin C, Bouchier C, Lechat P, Archambaud C, Creno S, Guin E, Wu Z, Kühbacher A, Brisse S, Pucciarelli MG, García-del Portillo F, Hain T, Portnoy DA, Chakraborty T, Lecuit M, Pizarro-Cerdá J, Moszer I, Bierne H, Cossart P. Comparison of widely used *Listeria monocytogenes* strains EGD, 10403S, and EGD-e highlights genomic variations underlying differences in pathogenicity. *MBio*. 2014 Mar 25; 5(2):e00969-14.

Blériot C, Dupuis T, Jouvion G, Eberl G, Disson O, Lecuit M. Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates Type 1 microbicidal inflammation and Type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity*. 2015; 42(1):145-58.

Bodemer C, Sauvage V, Mahlaoui N, Cheval J, Couderc T, Leclerc-Mercier S, Debré M, Pellier I, Gagnieur L, Fraitag S, Fischer A, Blanche S, Lecuit M, Eloit M. Live rubella virus vaccine long-term persistence as an antigenic trigger of cutaneous granulomas in patients with primary immunodeficiency. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jan 30. doi: 10.1111/1469-0691.12573

Charlier C, Hourrier S, Leruez-Ville M, Zahar JR, Floret D, Salomon LJ, Toubiana J, Lecuit M, Lapillonne A, Lortholary O, Kermorvant-Duchemin E. Polyvalent immunoglobulins in neonates after perinatal exposure to measles: Benefits and long-term tolerance of immunoglobulins. *J Infect*. 2015 Jan 22. pii: S0163-4453(15)00031-6.

Charlier C, Lecuit M. Infection and pregnancy: A threat for mother and child. *Presse Med*. 2014 Jun;43(6 Pt 1):662-4

Coeuret S, de la Blanchardiere A, Saguet-Rysanek V, Chèze S, Tavernier M, Arsène D, Criscuolo A, Brisse S, Vergnaud M, Verdon R, Lecuit M. *Campylobacter coli* cultured from the stools of a patient with immunoproliferative small intestinal disease. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jan 20. doi: 10.1111/1469-0691.12545

Crabot Y, Poiree S, Bougnoux ME, Maunoury C, Barete S, Zeller V, Arvieux C, Pineau S, Amazzough K, Lecuit M, Lanternier F, Lortholary O; French Mycosis Study Group. Last generation triazoles for imported eumycetoma in eleven consecutive adults. *PLOS Negl Trop Dis*. 2014 Oct 9;8(10):e3232. doi: 10.1371/journal.pntd.

Criscuolo A, de la Blanchardiere A, Coeuret S, Passet V, Saguet-Rysanek V, Vergnaud M, Verdon R, Leclercq A, Lecuit M, and Brisse S. Draft genome sequence of *Campylobacter coli* strain IPSID-1 isolated from a patient with immunoproliferative small intestinal disease (IPSID). *Genome Announc*. 2014 Mar 13; 2(2). pii: e00079-14.

Gessain G, Tsai YH, Travier L, Bonazzi M, Grayo S, Cossart P, Charlier C, Disson O, Lecuit M. PI3-kinase activation is critical for host barrier permissiveness to *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med*. 2015 Feb 9; 212(2):165-83.

Haase J, Didelot X, Lecuit M, Korkeala H, *L. monocytogenes* MLST study group and M Achtman. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large scale MultiLocus Sequence Typing study. *Environ Microbiol.* 2014 Feb; 16(2):405-16.

Her Z, Teng TS, Tan JJJ, Teo TH, Kam YW, Lum FM, Lee WWL, Gabriel C, Melchiotti R, Andiappan AK, Lulla V, Lulla A, Win MK, Chow A, Biswas SK, Leo YS, Lecuit M, Merits A, Rénia L, Ng LFP. Loss of TLR3 aggravates CHIKV replication and pathology due to an altered virus-specific neutralizing antibody response. *EMBO Mol Med.* 2014 Dec 1. pii: e201404459.

Lecuit M, Eloit M. The diagnosis of infectious diseases by whole genome next generation sequencing: a new era is opening. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014 Mar 6; 4:25.

Pilmis B, Sobel V, Lecuit M, Lortholary O, Charlier C. Antifungal drugs during pregnancy: an updated review. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Sep 8. pii: dku355.

Thomas L, Mailles A, Desestret V, Ducray F, Mathias E, Rogemond V, Didelot A, Marignier S, Stahl JP, Honnorat J; Steering Committee and Investigators Group. Autoimmune N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis is a differential diagnosis of infectious encephalitis. *J Infect.* 2014 May;68(5):419-25

Travier L, Lecuit M. *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a 'classic' virulence factor. *Curr Opin Microbiol.* 2014 Feb; 17:53-60.