

2012-2016



Institut Pasteur



INSTITUT  
DE VEILLE SANITAIRE



Centre National de  
Référence des *Listeria*

## Rapport d'activités (Version simplifiée du dossier de candidature)

Marc LECUIT  
Alexandre LECLERCQ

Avril 2011

*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 (A. Leclercq and M. Lecuit. 2011. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des Listeria – Année 2012-2016. Institut Pasteur, Paris, France) dont elles sont issues.*

# Table des matières

<b>1. DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE.....</b>	<b>4</b>
1.1. Proposition d'organisation pour répondre au cahier des charges.....	4
1.2. Moyens du laboratoire candidat.....	4
1.2.1. Ressources humaines .....	4
1.2.2. Locaux .....	7
1.2.3. Equipement .....	7
1.3. Descriptif des thématiques de recherche du laboratoire candidat .....	8
1.4. Capacités techniques du laboratoire candidat .....	9
1.4.1. Méthodes et marqueurs épidémiologiques disponibles.....	9
1.4.2. Maintien, détention et diffusion de matériel biologique .....	11
<b>2. BILAN 2006-2010 DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES .....</b>	<b>15</b>
2.1. Les activités au titre de l'expertise microbiologique.....	15
2.1.1. Contributions aux études épidémiologiques .....	15
2.1.2. Méthodes de diagnostic et atypies des souches.....	17
2.1.3. Etude de la virulence.....	20
2.1.4. Taxonomie .....	22
2.1.5. Développement de nouveaux outils de diagnostic .....	22
2.1.6. Développement de nouveaux outils de typage moléculaire et étude de la diversité des <i>Listeria</i> .....	24
2.1.7. Etude de la résistance aux antibiotiques.....	26
2.1.8. Evaluation de nouvelles thérapeutiques .....	27
2.2. Contribution à la surveillance épidémiologique ou à l'alerte .....	28
2.2.1. Données de la surveillance microbiologique de la listériose humaine.....	28
2.2.2. Caractérisation des souches d'origine non humaine .....	55
2.2.3. Bilan des investigations, signalements et alertes.....	64
2.3. Conseils aux professionnels et interactions avec les autorités de santé .....	69
2.3.1. Site et veille Internet .....	70
2.3.2. Cours et conférences sur invitation .....	70
2.3.3. Participation au Contrôle Qualité National de l'Afssaps .....	70
2.3.4. Demande d'informations et de conseils .....	70
2.3.5. Expertises.....	71
2.3.6. Retour d'informations .....	73
<b>3. LISTE DES PUBLICATIONS .....</b>	<b>74</b>
3.1. Publications nationales.....	74
3.2. Publications internationales.....	75
3.3. Communications nationales.....	78
3.4. Communications internationales.....	81
3.5. Conférences sur invitations.....	83
3.6. Interactions avec la presse .....	85

<b>3.7.</b>	<b>Contribution ou collaborations a des instances nationales et internationales .....</b>	<b>87</b>
3.7.1.	InVS .....	87
3.7.2.	ANSES et LNR <i>Listeria monocytogenes</i> .....	87
3.7.3.	AFSSAPS.....	87
3.7.4.	DGS .....	87
3.7.5.	DGAI et DGCCRF .....	87
3.7.6.	INRA.....	88
3.7.7.	Laboratoire Communautaire de Référence des <i>Listeria monocytogenes</i> .....	88
3.7.8.	European Center for Diseases Control: ECDC .....	89
3.7.9.	PulseNet Europe.....	90
3.7.10.	Centre Collaborateur OMS (CCOMS) .....	90
<b>4.</b>	<b>DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE QUALITE .....</b>	<b>92</b>
<b>5.</b>	<b>DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE .....</b>	<b>95</b>
<b>5.1.</b>	<b>Système Informatique de Laboratoire .....</b>	<b>95</b>
<b>5.2.</b>	<b>Gestion des données.....</b>	<b>95</b>
5.2.1.	Gestion des données clinico-biologiques : Logiciel LAGON® (EpiConcept).....	95
5.2.2.	Gestion des données de caractérisation/typage des souches : Logiciel Bionumerics 5.6® (Applied Maths)	96
5.2.3.	Grands axes de développement.....	96
<b>5.3.</b>	<b>Capacité du candidat à mettre en œuvre la transmission régulière et automatisée de données vers l'InVS</b>	<b>97</b>
<b>5.4.</b>	<b>Procédures visant au respect de la conformité à la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractères personnel ou les évolutions prévues. ....</b>	<b>97</b>

# **1. DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE**

## **1.1. Proposition d'organisation pour répondre au cahier des charges**

L'Institut Pasteur héberge depuis 1993 le Centre National de Référence des *Listeria* (CNRL) et, depuis 1992, le Centre Collaborateur OMS des *Listeria* (CCOMS).

Pour être en mesure de respecter le cahier des charges de l'appel à candidature pour la mandature 2012-2016, le Groupe Microorganisme et barrière de l'hôte, laboratoire candidat, bénéficie du cadre favorable offert par l'Institut Pasteur, qui possède une structure administrative coordonnant l'activité des CNRs placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur, qui héberge différentes unités de recherche travaillant sur *Listeria* et d'autres bactéries entéropathogènes, et des plates-formes technologiques diverses lui permettant un accès privilégié à un très large panel de techniques à haut débit et de grande technicité (<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/Recherche/plates-formes-technologiques>).

Le CNRL est également en contact constant avec un réseau de 660 biologistes français et l'ensemble des laboratoires vétérinaires départementaux, de la DGCCRF, des laboratoires privés d'hygiène des aliments (environ 250 correspondants).

En cas de crise sanitaire, le CNRL est en mesure de réceptionner des souches 24h/24h, 7j/7j, et peut bénéficier d'un renfort en personnel auprès de la cellule d'intervention d'urgence des risques biologiques (CIBU) de l'Institut Pasteur par des techniciens habilités aux méthodes du CNRL.

Les deux responsables du CNRL possèdent respectivement une expertise médicale clinique et microbiologique (M. Lecuit) et une expertise en microbiologie et sécurité alimentaire (A. Leclercq).

## **1.2. Moyens du laboratoire candidat**

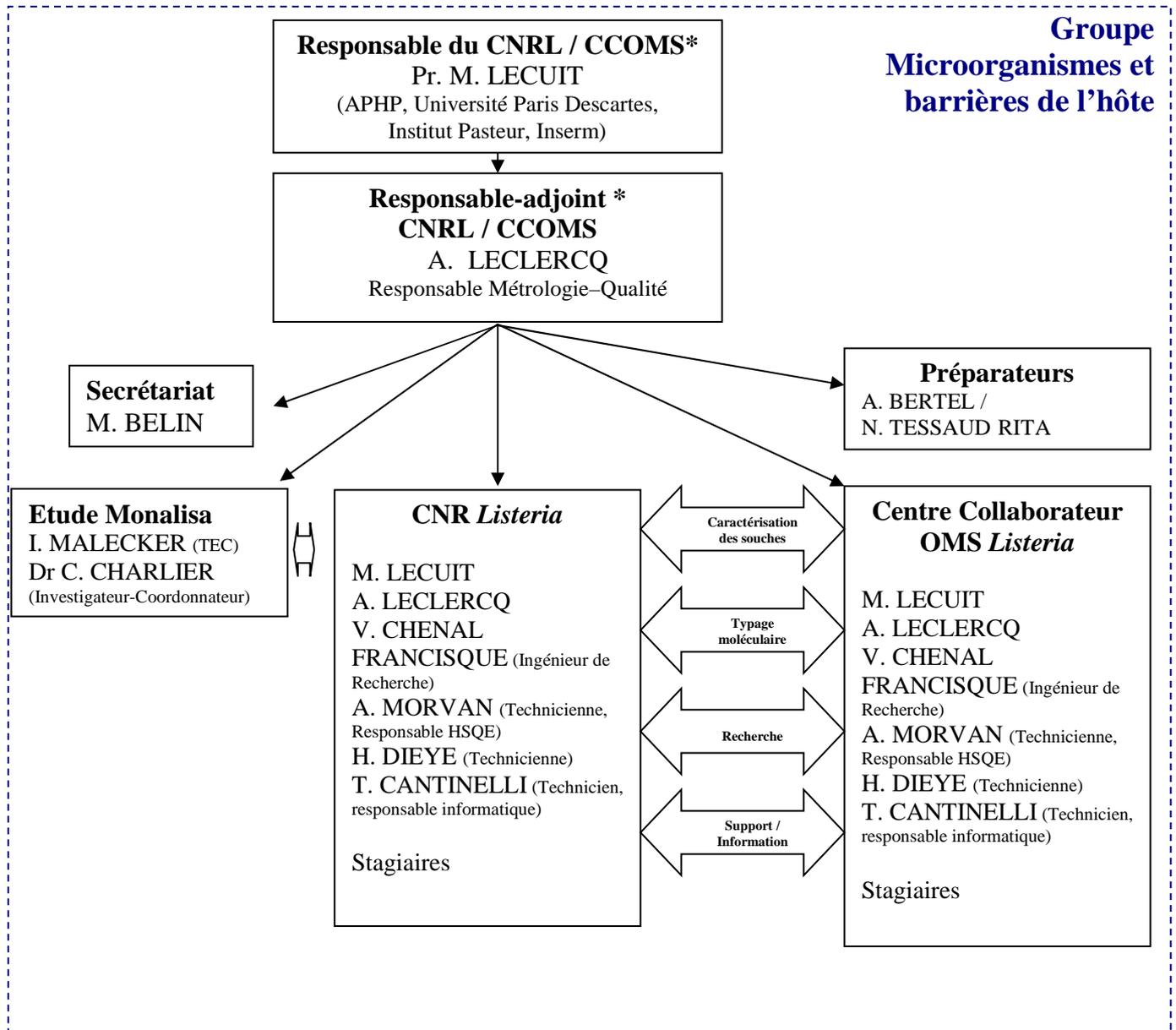
### **1.2.1. Ressources humaines**

#### **1.2.1.1. Le Responsable scientifique**

Marc Lecuit est professeur à l'Université Paris Descartes et praticien hospitalier à l'Hôpital Necker Enfants Malades dans le 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 le groupe Microorganismes et barrières de l'hôte, le CNRL (mandat 2006-2011) et le CCOMS des *Listeria*.

### 1.2.1.2. Organigramme général

Figure 1 : Organigramme Général du Personnel du CNR *Listeria*



\*, Le Dr A. Lemonnier était responsable du CNRL jusqu'au 31 décembre 2007. C. Jacquet était responsable-adjoint du CNRL jusqu'au 22 septembre 2006.

### 1.2.1.3. Etat des emplois remuneres - Effectif

L'effectif du personnel du CNRL est présenté dans le Tableau 1. Une partie de son personnel (préparateurs ou aides de laboratoire) est commun avec le pôle d'identification biologique de la cellule d'intervention d'urgence des risques biologiques (PIB-CIBU). Les cadres assurent également des astreintes à la cellule d'intervention d'urgence des risques biologiques (CIBU). Ils effectuent une permanence téléphonique et une possibilité d'intervention physique en cas d'urgences sanitaires ou de pertes d'intégrité des réactifs critiques et des collections du laboratoire les week-ends et jours fériés. La secrétaire travaille à mi-temps pour le CNRL et participe à l'investigation de cas atypiques de listérioses (recherche dans les archives de cas similaires, suivi des correspondances avec les laboratoires pour recueillir les données clinico-biologiques).

**Tableau 1 : Personnel statutaire de l'Institut Pasteur affecté au CNR des *Listeria***

Nom – Prénom	Libellé Emploi	ETP*
LECUIT Marc	Scientifique – Responsable	0,20
LECLERCQ Alexandre	Cadre A confirmé – Responsable-Adjoint	0,70
CHENAL FRANCISQUE Viviane	Ingénieur 2	0,30
MORVAN Anne	Technicienne supérieure de laboratoire Échelle 6	0,90
CANTINELLI Thomas	Technicien supérieur de laboratoire Échelle 5	0,80
DIEYE Hélène	Technicienne supérieure de laboratoire Échelle 5	0,90
BELIN Martine	Secrétaire Échelle 4	0,50
RITA TESSAUD Nathalie	Technicienne Échelle 3	0,32
BERTEL Arnaud	Aide de Laboratoire Échelle 3	0,35
<b>TOTAL Equivalent Temps Plein (ETP)</b>		<b>4,97</b>

\*ETP *Equivalent Temps Plein*.

### 1.2.2. Locaux

#### Laboratoires et bureaux :

Le CNRL est hébergé à l'Institut Pasteur au second étage du bâtiment Roux (53A) de l'Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75015 Paris.

Les pièces suivantes (sur 70 m<sup>2</sup> environ) sont dédiées à l'activité du CNRL ainsi qu'au Centre collaborateur de l'OMS *Listeria* (CCOMS) :

#### Pièces du CNRL :

Pièce 6A : Bureau de l'Ingénieur de recherche du CNRL/CCOMS, partagée avec un(e) étudiant(e) en doctorat et un stagiaire et servant également de salle de réunion et de bibliothèque,

Pièce 6 : Secrétariat – Bureau administratif,

Pièce 5B : Bureau du Responsable-adjoint du CNRL/CCOMS,

Pièce 5 : Laboratoire L2, accueillant 5 personnes et incluant une salle de PCR, une salle d'électrophorèse et de centrifugation et une salle de pesée des produits chimiques,

Pièce 30 : Archives et conservation des souches en congélateur à -80°C,

Pièce 31 : Pièce avec conditionnement d'air comportant la collection de microorganismes du CNRL.

#### Pièces partagées du CNRL :

Des pièces sont partagées avec d'autres CNR et laboratoires de l'Institut Pasteur et se situent au même étage : une laverie/salle des autoclaves, une salle de préparation et une chambre froide.

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

### 1.2.3. Equipement

L'ensemble des équipements scientifiques fait l'objet d'un suivi métrologique (Etalonnage-Cartographie et/ou vérification et, en 2010, d'un suivi continu des températures).

#### *Matériel, équipements utilisés*

- Matériel courant d'un laboratoire réglementaire de confinement L2 de microbiologie classique et de biologie moléculaire,
- 1 poste de sécurité microbiologique,
- 3 étuves,
- 3 bains thermostatés humides et 3 bains thermostatés à sec,
- 1 four à hybridation,
- 5 réfrigérateurs,
- 2 congélateurs ;

- 1 congélateur -80°C,
- 1 microscope,
- 3 centrifugeuses dont une pour les plaques,
- 3 équipements d'électrophorèse en champs pulsés partagés avec d'autres CNR,
- 3 thermocycleurs en point final,
- 2 générateurs et cuves d'électrophorèse,
- 1 balance de précision,
- 1 fax-copieur.

#### *Equipements partagés*

- 1 autoclave,
- 1 machine à laver la vaisselle,
- 1 autopréparateur de milieux de culture,
- 1 inoculateur multipoint partagé avec le CNR de la résistance aux antibiotiques
- 1 système de prises de vues photographiques couplé à un ordinateur
- 1 machine à glace,
- 1 balance de précision,
- 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 gérés 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

- CNR de la coqueluche et CIBU : Accès à un appareil (site) de PCR en temps réel
- Plate-forme Génomique (PF1)
- Plate-forme Puces à ADN (PF2)
- Plate-forme de Génotypage des Pathogènes et Santé Publique (PF8)
- Animalerie des agents pathogènes.

### **1.3. Descriptif des thématiques de recherche du laboratoire candidat**

Notre laboratoire étudie les mécanismes physiopathologiques des infections invasives, et notamment celles dues à des microorganismes responsables d'infections du système nerveux central, particulièrement chez le nouveau-né. Les pathogènes modèles étudiés sont *Listeria monocytogenes*, le streptocoque du groupe B, et le virus Chikungunya, dont nous avons montré qu'il était capable d'induire des infections néonatales et que celles-ci se caractérisaient par leur gravité et la dissémination du virus au système nerveux central.

Le laboratoire s'intéresse tout particulièrement aux mécanismes qui permettent à *Listeria* de traverser les barrières de l'hôte: la barrière intestinale, dont le franchissement signe l'invasion de l'hôte, et les barrières placentaires et hémato-encéphalique, dont le franchissement permet à *Listeria* d'atteindre ses tissus cibles.

Nous combinons des approches classiques de microbiologie moléculaire et de biologie cellulaire, en tentant de respecter un continuum entre les études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Nous utilisons des techniques d'imagerie dynamique et en temps réel pour visualiser et étudier le processus infectieux au niveau tissulaire, dans son environnement "natif".

En complément de ces approches expérimentales et fondamentales, nous développons une approche génomique, visant à étudier, décrire et comprendre la biodiversité au sein du genre *Listeria* et particulièrement de l'espèce *monocytogenes*, dans l'objectif d'identifier de la façon la plus exhaustive les facteurs de *Listeria* associés à sa virulence. Cette étude a deux objectifs complémentaires : mieux comprendre la physiopathologie de l'infection et identifier des marqueurs moléculaires qui pourraient être associés au pouvoir pathogène des isolats.

Nous développons également des projets de recherche clinique, afin de mieux décrire l'histoire naturelle de la listériose humaine, d'en préciser les caractéristiques cliniques, radiologiques et biologiques, d'identifier des facteurs pronostiques, et de tenter de développer de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques. Nous avons lancée une vaste étude prospective et multicentrique nationale qui nous permettra également à terme d'identifier d'éventuels nouveaux facteurs de susceptibilité de l'hôte à cette infection, dont la morbi-mortalité reste particulièrement élevée.

## **1.4. Capacités techniques du laboratoire candidat**

### **1.4.1. Méthodes et marqueurs épidémiologiques disponibles**

Le CNRL reçoit les souches isolées de patients par les biologistes médicaux [laboratoires publics hospitaliers et plus rarement de Laboratoires d'Analyses de Biologie Médicale (LABM) privés] et également des souches isolées d'aliments ou de l'environnement envoyées par les laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments publics agréés (LVD, LDA, SCL, Laboratoires privés, etc.) dans le cadre d'alertes produits de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) ou de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes ou d'investigations autour de cas ou d'autocontrôles.

Ces souches 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<sup>®</sup> (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*<sup>®</sup> (bioMérieux, France)] et recherche du caractère hémolytique, complétés par d'autres tests classiques si nécessaire. Les souches atypiques, extrêmement rares en ce qui concerne les souches isolées de patients, font l'objet d'investigations complémentaires appropriées. En cas de difficultés d'identification d'une souche envoyée par un correspondant, le CNRL effectue une amplification génique et un séquençage sur environ 1400

pb du gène codant les ARNr 16S. Cette activité permet le cas échéant d'identifier de nouvelles espèces de *Listeria*, comme ce fut le cas pour *L. rocourtiae* en 2009. Toutes les souches non *Listeria* présentant des caractéristiques phénotypiques du genre sont expertisées par cette dernière méthode pour obtenir une identification définitive et assurer un rendu « Non *Listeria* » aux laboratoires correspondants pouvant être étayé par une identification moléculaire, et d'ainsi éviter une déclaration erronée aux autorités de santé publique.

- **Détermination du sérotype PCR** selon la méthode publiée par le CNRL (Doumith et coll., 2004 et 2005) qui 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 *L. monocytogenes* permettant de déterminer le « sérotype PCR ». Dans le cadre d'urgence sanitaire concernant des cas de listérioses, le CNRL effectue cette PCR multiplex directement sur la culture sur gélose nutritive de la souche envoyée par le correspondant. Il en est de même quand le CNRL a constaté la réception d'une souche identifiée comme n'appartenant pas au genre *Listeria*. La PCR multiplex est alors directement effectuée sur colonies confluentes de la souche réceptionnée sur gélose nutritive pour documenter la présence de *Listeria* et déterminer son sérotype.

- **Analyse des profils de macrorestriction d'ADN génomique** (PFGE : électrophorèse en champs pulsé) obtenus au moyen du système d'électrophorèse CHEF et des enzymes de restriction *AscI* et *ApaI* selon le protocole international standardisé du CDC d'Atlanta et des réseaux PulseNet décrit par Graves *et coll.* en 2001 (Graves et Swaminathan, 2001). Dans certains cas, 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<sup>ème</sup> enzyme sert : (i) à différencier des profils très proches avec les enzymes *AscI/ApaI* (1 ou 2 bandes de différences) pour leur attribuer un numéro correct de nomenclature et les relier éventuellement à un signalement ou une alerte ce qui a été approuvé par la cellule *Listeria* le 23/04/2007; (ii) dans le cas d'un signalement ou d'une alerte produit ou d'une forme neuroméningée, à différencier les souches ayant les mêmes profils *AscI* et *ApaI*, mais un profil *SmaI* différent afin de permettre à l'InVS d'établir des clusters d'investigations, d'écarter certains cas humains ou des produits alimentaires lors de l'étude d'éventuels cas groupés. En cas d'épidémie ou de crise, le CNRL peut multiplier par 2 sa capacité de typage par l'utilisation des équipements d'autres structures de l'Institut Pasteur et après accord des responsables de ces entités.

- **Antibiogramme** de toutes les souches d'origine humaine en utilisant la technique de dilution en milieu gélosé selon les 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. Le mécanisme de résistance peut ensuite être étudié.

Des analyses complémentaires peuvent également être effectuées, dans le cadre de projets de recherche :

- **Analyse phylogénétique des souches.** Sur la base du schéma MLST que le CNRL a établi, les souches d'intérêt de *L. monocytogenes* 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 de souches** en collaboration avec la plate-forme de santé publique PF8.

## **1.4.2. Maintien, détention et diffusion de matériel biologique**

### **1.4.2.1. Les différentes collections de souches bactériennes**

Leur mise en collection permet de disposer d'une banque de souches (associées à une banque de données scientifiques et clinico-biologiques) importante, gérée sous procédure de management de la qualité.

Par ailleurs, 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 serums de sérotypie non commercialisés.

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

Le CNRL dispose des souches types des 10 espèces et sous-espèces du genre *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* subsp. *grayi*, *L. grayi* subsp. *murrayi*, *L. rocourtiae* et *L. marthii*) ainsi que des 15 souches de référence pour la sérotypie. 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 de plus de 1.300 souches, parfois beaucoup plus en situation épidémique (10.000 souches annuelles dans les années 1990) et quelle que soit leur origine. Environ 55.000 souches de cette collection proviennent du CNRL. Ces souches sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée. Cette collection, majoritairement française, mais également internationale (CCOMS) comportait environ 106.000 souches à la fin de l'année 2010. Ces souches sont d'origine clinique, environnementale et alimentaire ainsi que vétérinaire ou de recherche. Néanmoins, le CNRL conserve certaines 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 majeur de cette collection léguée au CCOMS des *Listeria* est de contenir des souches anciennes, isolées depuis la première souche de *L. monocytogenes* (1926), de diverses origines géographiques, une majorité de souches ayant été isolées en France et Allemagne. Certaines de ces souches sont actuellement utilisées dans le cadre de projets de recherche concernant notamment l'étude de l'évolution et de la biodiversité de *Listeria*. Ces souches sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée. Un état des lieux de cette collection est actuellement en cours : il vise à vérifier la viabilité des souches et les données associées afin de les référencer à terme au sein de la base informatisée générale de données du CNRL.

#### *Collection ILSI North America*

Il s'agit de la collection du Technical Committee on Food Microbiology of ILSI North America contenant 43 isolats dont 25 souches représentent la diversité des *L. monocytogenes* et les autres des souches d'épidémies, et mise à disposition du CCOMS. Ces souches sont utilisables pour évaluer et valider des méthodes d'analyse ou celles de typage moléculaire et réaliser des essais de microbiologie prévisionnelle ou de croissance/survie comme dans les aliments. Ces souches sont conservées à -80°C en tube de cryo-billes dans un congélateur sous alarme permanente.

#### *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 (accréditée COFRAC selon l'EN ISO 17025 pour des essais de caractérisation des souches et certifiée AFAQ EN ISO 9001 pour son organisation) 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, souches de référence, souches types, etc.) ainsi que les souches de référence de taxonomie et de sérotypie. Des souches du genre *Listeria* et de l'espèce *L. monocytogenes* ayant des propriétés originales sont régulièrement mises en collection. Les informations associées aux souches sont regroupées dans une base de données informatique (logiciel ARPAS). Moyennant une somme couvrant les frais d'envoi et de maintien en collection sous assurance qualité, le CRBIP facilite ainsi l'accès de ces ressources biologiques aux clients, aux chercheurs, en France et à l'étranger suivant les normes de sécurité pour la santé et l'environnement, conformément aux règlements et aux lois en vigueur, en assurant une utilisation durable et une traçabilité.

#### **1.4.2.2. Les serums**

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. Aucune commercialisation ou distribution de ces sera n'a été effectuée entre 2006 et 2010. Chaque sérum représenterait un coût annuel de production de 800 euros/10 ml et la poursuite de la production annuelle des sera pour les *Listeria* représenterait 25% du budget de fonctionnement du CNRL. Le CNRL détient également l'ensemble des serums Denka Seiken commerciaux de sérotypage des *Listeria monocytogenes*. Entre 2006-2010, les laboratoires correspondants ont préféré envoyer leurs souches à sérotyper que de recevoir les serums.

#### **1.4.2.3. Les bactériophages**

Le CNRL possède la collection de bactériophages de lysotypie du Centre International de Lystopie des *Listeria* (1982-1992 ; Institut Pasteur, Paris). Cette collection présente un regain d'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 telles que le fromage.

#### **1.4.2.4. Conditions de mise à disposition des collections**

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectées dans le cadre de l'activité des CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place *a 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 la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou pas à une contrepartie financière.

Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. L'unité de recherche reconnue CNR, de part la valorisation de son savoir-faire et de son expertise sur le matériel biologique concerné, reste détenteur des prélèvements biologiques et données associées ou propriétaire des droits existants sur les souches et données associées y afférant.

Différents points essentiels sont appréhendés dans ces accords :

- le partenaire s'engage à n'utiliser les souches, les prélèvements biologiques et données associées que dans le cadre d'un programme de recherche défini spécifiquement.
- les résultats issus du programme de recherche devront systématiquement être communiqués par le partenaire au CNR ; le CNR sera également associé ou remercié dans les publications et/ou aux communications.

- le tiers partenaire s'engage à ne pas transférer les souches, les prélèvements biologiques et les données associées à des tiers et à retourner ou détruire le matériel biologique à la fin du programme de recherche.

En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique et veille à ce que la valorisation du savoir-faire et de l'expertise du CNR ayant conservé, traité, trié et analysé le matériel biologique soit garantis au titre de l'accord.

Lorsque le matériel biologique et les données associées sont mis à disposition dans le cadre d'une collaboration scientifique par laquelle les partenaires s'associent de manière plus conséquente à la réalisation du programme de recherche, la valorisation des travaux menés conjointement devra tenir compte des apports respectifs de chacun des partenaires.

Les accords excluent toute garantie relative (i) à la nature appropriée des souches, des prélèvements biologiques et données associées pour une utilisation spécifique et (ii) à la qualité non-infectieuse du matériel biologique.

L'interdiction de l'utilisation du matériel biologique sur l'homme et sur les animaux, le cas échéant, est également stipulée dans l'accord.

Enfin, le CNR n'assume aucune responsabilité quant à l'utilisation du matériel biologique par le partenaire.

## **2. BILAN 2006-2010 DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES**

### **2.1. Les activités au titre de l'expertise microbiologique**

Le Groupe Microorganismes et barrières de l'hôte auquel le CNR des *Listeria* est affilié, participe aux 3 missions de l'Institut Pasteur : Expertise et Santé Publique, Enseignement et Recherche. Chaque année, l'Institut Pasteur attribue un budget propre de recherche et une affectation de ressources humaines et matérielles au CNRL et au CCOMS en complément de celui octroyé par l'InVS pour le CNRL. Ce budget permet notamment de développer des projets de recherche qui sont à l'interface entre les activités de surveillance du CNR et les activités de recherche fondamentale du groupe.

Cette recherche se nourrit de notre activité de référence et vient également guider celle-ci. Elle comporte un volet de recherche appliquée, qui découle directement de notre activité de référence, et vise à améliorer les aspects techniques et diagnostiques. S'y accole un volet plus fondamental, développé en lien avec la PF8, 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*. Cette approche devrait nous permettre d'identifier des spécificités des souches cliniques par rapport aux souches environnementales et notamment alimentaires.

Enfin, un troisième volet concerne les aspects physiopathologiques et est développé dans l'esprit d'un continuum le plus concret possible entre activités cliniques, microbiologiques, épidémiologiques et fondamentales.

#### **2.1.1. Contributions aux études épidémiologiques**

##### *Les alertes « produits alimentaires » à *Listeria monocytogenes**

Le but de cette étude impliquant le CNRL, la DGAI, l'InVS et la DGCCRF était de caractériser les alertes des produits alimentaires françaises en 2008 pour *Lm*. En 2008, 280 alertes produits pour *Lm* ont été enregistrées, principalement au niveau de la distribution (184), d'autocontrôles (215) et du contrôle officiel (65). 84 alertes produits concernaient des souches alimentaires microbiologiquement semblables aux souches humaines, mais aucune alerte produit n'a été liée à des cas humains en 2008. Même si de fortes contaminations des aliments étaient observées, les alertes produits n'étaient pas à l'origine ou suivies par des cas humains en 2008. De plus avec les mesures exécutées par les exploitants du secteur alimentaire dans le contexte de leur plan de contrôle sanitaire, les mesures de gestion des aliments liées aux alertes produits ont pu contribuer dans la situation française d'absence d'épidémie à *Lm* depuis 2003. La rédaction d'une synthèse des conclusions de ce travail est en cours.

### *Enquêtes alimentaires autour des cas sporadiques de listérioses neuroinvasives*

Cette étude de l'InVS à laquelle le CNRL a participé concernait l'évaluation du résultat des enquêtes exécutées entre 2003 et 2008 par l'InVS. 150 cas ont été examinés. Pour 22 enquêtes, les souches alimentaires ou environnementales avaient le même profil PFGE que celui de la souche du patient. Les enquêtes alimentaires des cas de listérioses peuvent conduire à des mesures de maîtrises dans des sites de production contaminés et limiter la taille des épidémies/cas groupés de listérioses en identifiant rapidement leurs sources. Cependant le rendement de ces enquêtes est limité par le fait que de nombreux produits alimentaires déballés et non étiquetés dans les réfrigérateurs du patient ne peuvent être identifiés. Notons que ces investigations ont également permis de montrer que les souches de *Lm* peuvent coloniser l'environnement de cuisines hospitalières.

### *Evaluation des critères d'investigation des cas groupés*

L'InVS et le CNRL ont analysé de façon rétrospective tous les cas groupés de listériose signalés par le CNRL entre 2000 et 2004 afin de tenter de redéfinir les critères de signalement. Les résultats de cette étude suggéraient une approche en 2 temps : 1) si 3 cas groupés sont identifiés durant une période de 6 semaines, le CNRL signale les cas à l'InVS pour accentuer les investigations des cas ; 2) si 6 cas sont identifiés, l'InVS coordonne des investigations épidémiologiques, environnementales et microbiologiques complémentaires afin d'identifier la source de contamination. L'utilisation de ces nouveaux critères a permis de réduire le nombre d'investigations improductives en concentrant les efforts sur les cas les plus critiques. En 2008, l'InVS a sollicité le CNRL pour connaître rétrospectivement ce qu'aurait donné la surveillance si le critère de 14 semaines pour définir un signalement avant 2006 n'avait pas été changé. Le CNRL a donc mis au point un programme informatique permettant de changer les critères du signalement et a simulé plusieurs scénarios sur sa base de données. L'analyse de ces simulations est en cours.

### *Augmentation du nombre de cas français et européens de listérioses*

Les causes de l'augmentation des cas constatée en France de 2005 à 2007 restent inconnues et différentes hypothèses ont été formulées au sein de la Cellule *Listeria*. Suite à une auto-saisine de l'Afssa (saisine n°2008-SA-0174) en date du 02 juillet 2008, un rapport dont le CNRL est co-auteur avec l'ANSES et l'InVS a été édité en 2010 : « Recrudescence des cas de listérioses humaines en France et en Europe et le lien possible avec les pratiques alimentaires ».

### *Etude des formes materno-fœtales depuis 1984*

En collaboration avec l'InVS, le CNRL a analysé les données épidémiologiques globales fournies par le CNRL et les réseaux de surveillance entre 1984 et 2006. L'analyse détaillée de 401 cas déclarés par le système de la DO entre 1999 et 2006 a permis de préciser les caractéristiques de ces infections.

L'incidence des cas de listériose MN a fortement diminué entre 1984 (60 cas/100.000 naissances vivantes) et 2006 (3 cas/100.000 nv). La listériose MN peut toucher le couple mère-enfant à toute période de la grossesse et provoquer des infections néonatales (59%), des morts fœtales in utero (26,5%) et des infections maternelles isolées (14,5%). Les mortalités in utero et néonatales diminuent selon l'âge gestationnel.

L'étude rétrospective de 75 dossiers cliniques mère-enfant de listériose MN diagnostiquée en Île-de-France entre 2000 et 2006 a permis de préciser les signes cliniques d'appel, la contribution des examens complémentaires dans le diagnostic de l'infection, la prise en charge thérapeutique. L'analyse des dossiers a mis en évidence que le défaut d'information des femmes ou le non-suivi des grossesses constitue la principale cause de non suivi des recommandations des règles hygiéno-diététiques permettant la prévention de la listériose.

Par ailleurs, 52 dossiers cliniques (mère et nouveau-nés) correspondant à des cas d'infection materno-fœtale diagnostiqués en Île-de-France entre 2000 et 2006, sont en cours d'analyse. Cette étude a permis non seulement de préciser les caractéristiques des infections chez la mère et les nouveau-nés et notamment d'évaluer l'impact des mesures de prévention.

### *Etude des effets des traitements antagonistes du TNF Alpha*

Dans le cadre des données recueillies par l'observatoire RATIO, les cas français de listériose depuis 2004 pour lesquels le patient a reçu un traitement antagoniste du TNF  $\alpha$  (influximab, etanercept, adalimumab, etc.) ont été colligés et seront étudiés avec l'observatoire RATIO.

## **2.1.2. Méthodes de diagnostic et atypies des souches**

### *Profil atypique de sérotype PCR de *L. monocytogenes**

En 2006 et 2007, trois profils atypiques de sérotype PCR ont été observés chez des souches de *Listeria monocytogenes* appartenant au sérovar 4b. Le CNRL a caractérisé phylogénétiquement ces souches et a amendé par publication son schéma de groupage PCR en décrivant un nouveau profil IVb-v1 pour les souches du groupe PCR IVb. Cette étude a servi à une investigation en Allemagne où des souches avec ce profil atypique ont été récemment à l'origine de cas groupés.

### *Profils de macrorestriction d'ADN différents pour des souches provenant du même patient*

Le CNRL étudie des profils de macrorestriction d'ADN différents pour des doublons de souches humaines : souches provenant de colonies différentes sur la même boîte d'isolement ou souches provenant du même patient dans des prélèvements différents ou à des dates différentes. Le CNRL évalue l'hypothèse d'une co-infection par deux souches différentes de *L. monocytogenes* ou l'influence des traitements sur la sélection éventuelle de variants au cours du processus infectieux.

### *Evaluation des L. monocytogenes 4ab*

Suite à la constatation que des laboratoires français et étrangers avaient des difficultés à sérotyper les souches de *L. monocytogenes* de sérovar 4ab en raison de la mauvaise qualité du sérum IX des kits, le CNRL s'est posé la question de l'appartenance réelle de ces souches dites 4ab à l'espèce *monocytogenes* et si le sérovar était correctement déterminé. 19 souches dites *L. monocytogenes* 4ab ont été étudiées et ne sont pas de l'espèce *monocytogenes*, mais *innocua*, ce qui explique les difficultés de sérotypage : le séquençage de 1400 pb du gène de l'ADNr16s a permis d'identifier ces souches comme appartenant à l'espèce *L. innocua*. Un correctif au schéma de sérotypage est en cours de rédaction.

### *Absence de catalase de souches de L. monocytogenes*

Cinq souches de *L. monocytogenes* (*Lm*) catalase négative (alors que le genre *Listeria* est catalase positive) ont été isolées de canards et d'environnement d'abattoirs de volailles. Ces souches ont été comparées à des souches humaines de *Lm* également catalase négative issues de cas de méningites en Angleterre et en Allemagne. Cette étude a montré que la perte de la catalase ne semblait pas avoir d'impact sur la virulence, qu'une source de ces souches catalase négative était alimentaire et que le test catalase, qui est un caractère phénotypique majeur du genre *Listeria*, doit donc être reconsidéré. Le support génétique de cette perte de fonction et son lien avec la virulence des souches sont en cours d'investigation.

### *Développement d'une méthode de référence d'isolement de L. monocytogenes dans les selles et études de cas de gastroentérites à Listeria*

Des épidémies de gastroentérites fébriles à *L. monocytogenes* (*Lm*) ont été décrites, sans toutefois qu'elles ne se compliquent nécessairement de listériose invasive. Le CNRL a étudié des cas de bactériémies, précédées d'une gastroentérite, et a tenté de mettre en évidence *Lm* dans les selles et le sang de ces patients. En 2008, les selles prélevées pendant la période de gastroentérite fébrile de 3 patients ayant déclaré une bactériémie ont été étudiées. Ceci a permis l'isolement par la méthode d'inoculation directe sur gélose ALOA™ de *Lm*. Cette méthode simple et efficace d'isolement de *Lm* pourrait donc être utilisée pour mettre en évidence *Lm* à partir de coprocultures.

Pour chaque patient étudié, la souche de *Lm* isolée dans les selles au cours de l'épisode de gastroentérite fébrile était similaire à celle responsable de la bactériémie, démontrant que la phase intestinale de l'infection conduisant à une listériose invasive peut être symptomatique. En cas de gastroentérite fébrile où aucune bactérie entéropathogène classique n'est détectée (*Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, EPEC), la recherche et la mise en évidence de *Lm*, notamment chez les personnes à risque de listériose, permettraient un traitement précoce susceptible de prévenir les complications graves, notamment neurologiques et fœtales, de la listériose.

*Projet MONALISA: Multicentric Observational National Analysis of LIsteriosis and Listeria*

Les différentes formes de la listériose restent très mal caractérisées dans leurs aspects cliniques, diagnostiques et thérapeutiques. Seules sont disponibles des séries rétrospectives fondées sur des compilations très hétérogènes de malades. L'évolution des malades est également très mal connue, et aucun facteur pronostique n'a été à ce jour identifié. Un projet d'étude a été financé afin de résoudre ce problème.

*Objectif principal du projet* : 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 du projet* :

- 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 biothèque 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 précédents l'inclusion.
- Témoins : patient présentant un terrain et un tableau clinique compatibles 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).

*Durée de participation* : cas : 3 mois, témoins : un jour (celui de l'inclusion).

*Chronologie de l'étude* :

J0 : pour tous les malades : évaluation clinique et prélèvement biologique sanguin

M3 : pour les patients adultes : évaluation clinique de l'évolution et des séquelles de l'infection

*Nombre de sujets nécessaires* :

100 patients cas /forme d'infection : materno-néonatale, septicémique et neurologique (total 300)

200 patients témoins / forme d'infection : materno-néonatale, septicémique et neurologique (total 600)

*Perspectives* :

Cette étude, la première réalisée prospectivement dans le cadre de cette infection devrait permettre :

- d'améliorer la prise en charge thérapeutique de la listériose ;
- de caractériser des facteurs de risque de survenue et d'évolution (pronostic) de cette infection ;
- de constituer une bibliothèque permettant d'évaluer ultérieurement de nouveaux outils diagnostiques des infections à *L. monocytogenes* dont la sérologie.

### **2.1.3. Etude de la virulence**

*Infection à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii**

Le genre *Listeria* contient deux espèces pathogènes : *Listeria monocytogenes* (*Lm*) qui infecte les hommes et les animaux, et *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* (*Lii*), considérée comme un pathogène spécifique des ruminants. Le CNRL a décrit un cas de gastroentérite et de bactériémie à *Lii* chez un patient transplanté rénal. Comme pour *Lm*, la source de contamination est alimentaire et la porte d'entrée de *Lii* est digestive. Une revue de la littérature a identifié 8 cas, survenus majoritairement chez des patients immunodéprimés. La rareté des infections humaines reflète probablement la faible exposition rendant compte de l'occurrence rare de cette espèce dans la nature comparée à *Lm*.

Lors de cette investigation, le CNR des *Listeria* a optimisé la méthode de typage par macrorestriction d'ADN des *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*. Ceci a été rendu possible par une collaboration avec l'Unité de Génétique des Génomes Bactériens de l'Institut Pasteur (Ph. Glaser) qui nous a donné accès aux données, non publiées, du séquençage du génome de *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*.

En 2008 et 2009, le CNRL a affiné sa méthode de typage pour *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* et a surveillé particulièrement les souches humaines et non-humaines transmises sans constater de nouveau cas.

#### *Investigation de formes atypiques de listériose*

En 2009, deux cas de formes néonatales atypiques ont été observés et sont actuellement étudiés. Le premier cas concerne un grand prématuré d'un kilogramme avec une coproculture positive à 100.000 cfu/g de *L. monocytogenes* 8 jours après l'accouchement d'une mère traitée pour fièvre en péripartum. Le second cas concerne un enfant présentant un méconium positif à *L. monocytogenes* alors que sa mère avait été traitée par amoxicilline à plusieurs reprises avant l'accouchement pour de multiples épisodes de métrorragies et ne présentait pas de symptômes de listériose à l'accouchement. En 2010, un cas d'infection urinaire chez un homme et deux cas de cholécystites ont été répertoriés. Les souches sont en cours de caractérisations tant pour leurs propriétés phénotypiques comme leur résistance aux sels biliaires et leur virulence. Ces cas feront l'objet de publication.

#### *Etude de l'expression de l'InlA de L. monocytogenes*

L'internaline (InlA) de *L. monocytogenes* permet son internalisation dans les cellules épithéliales et la traversée des barrières intestinale et placentaire *in vivo*. Nous avons démontré précédemment que certaines souches expriment une InlA 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 *inlA* a été également séquencée. Les résultats de cette étude vont aboutir à une méthode simple de caractérisation des souches quant à leur expression en surface d'InlA. Nous investiguons également la fréquence de cette troncature au sein de différents groupe PCR de *L. monocytogenes*, et étudions les caractéristiques phénotypiques de ces souches exprimant une InlA tronquée.

#### *Etude de la traversée de la barrière placentaire par L. monocytogenes*

L'ingestion d'aliments contaminés par *L. monocytogenes* peut soit n'induire aucun symptôme, soit engendrer une gastroentérite, une septicémie, une infection foeto-placentaire ou une infection du système nerveux central. Afin d'optimiser la prévention et le traitement de la listériose humaine, il est crucial de comprendre la physiopathologie de cette infection. Nous étudions les mécanismes moléculaires qui rendent compte de la capacité de *L. monocytogenes* à franchir les barrières intestinale, placentaire et hémato-encéphalique. Des études *in vitro* ont permis de démontrer la contribution majeure des protéines bactériennes InlA et InlB dans l'internalisation de *L. monocytogenes* dans les cellules non phagocytaires. La génération de modèles murins par transgénèse et knock-in prenant en compte les spécificités d'espèces de ces deux protéines a permis de démontrer leur rôle clé dans le franchissement des barrières de l'hôte.

### *Etude de souches hypovirulentes et avirulentes*

Dans le cadre d'un projet avec l'INRA UR 918 Pathologie infectieuse et Immunologie de Tours, plusieurs souches avirulentes ou hypovirulentes ont été détectées dans un modèle de formation de plage de lyse et d'inoculation à la souris. La caractérisation de ces souches inclut leur typage moléculaire (groupe PCR, pulsotype, etc.) et le séquençage des gènes codant les principaux facteurs de virulence (LLO, ActA, InlA, PlcB, etc.). Par ailleurs, le CNRL a inclus ces souches dans sa base de données MLST afin de pouvoir analyser les processus évolutifs ayant conduit à l'émergence de ces souches en les comparant aux souches virulentes de *L. monocytogenes* isolées de cas de listériose.

#### **2.1.4. Taxonomie**

##### *Etude de L. marthii sp. nov.*

En collaboration avec le Dr L. Graves du CDC d'Atlanta nous avons étudié une nouvelle espèce de *Listeria*, *L. marthii* provenant d'une origine environnementale (eau, sol) en utilisant l'ensemble des outils de caractérisations phénotypiques et génotypiques que possédait le CNRL. Les résultats sont en cours d'analyse.

##### *Etude de Listeria rocourtiae sp. nov.*

Une souche a été isolée de laitue pré-coupée en Autriche correspondant à un isolat du genre *Listeria* bien qu'il ne pouvait être assigné à aucune espèce connue. La comparaison de la séquence du gène *rrs* (codant pour le 16 rRNA) et le contenu en gènes déterminé grâce à l'utilisation d'une puce à ADN confirment l'affiliation au genre *Listeria*. La distance phylogénétique avec les espèces connues de *Listeria* indique qu'elle représente une nouvelle espèce. Puisqu'elle peut être différenciée des autres espèces connues de *Listeria* en utilisant des tests phénotypiques, le nom *Listeria rocourtiae* a été adopté pour cette nouvelle espèce. La souche type est CIP 109804 (T) (= DSM 22097 (T), Allerberger 700284/02 (T)). La souche type est avirulente selon les résultats des tests conduits sur cultures cellulaires et inoculation de souris.

#### **2.1.5. Développement de nouveaux outils de diagnostic**

##### *Utilisation du gène iap pour l'identification des Listeria*

Le CNRL a participé à l'identification et l'étude de souches tunisiennes au moyen de puces à ADN comportant des sondes pour le gène *iap* (invasion associated protein) codant pour la protéine p60 qui est exprimée en surface de la bactérie. La différence dans la séquence du gène *iap* permet d'identifier avec précision l'espèce au sein du genre *Listeria* et principalement *monocytogenes* ce qui en fait une méthode alternative d'identification.

### *Amélioration de l'identification moléculaire des Listeria*

Les *Listeria* peuvent être identifiées par l'analyse de la séquence de leur gène 16S rDNA, mais certaines espèces sont difficiles à différencier par cette méthode. En partenariat avec le pôle d'identification bactérien de l'Institut Pasteur, les différents gènes permettant l'identification moléculaire des bactéries Gram+ ont été testés sur des souches de référence. Le but est de proposer une PCR d'identification alternative au 16S ADNr pour les LABM d'hôpitaux. Les résultats de ces investigations sont en cours d'analyse.

### *Evaluation du milieu Rapid L. Mono™ et du test ALOA-Confirmation™*

Afin d'optimiser l'identification de l'espèce *L. monocytogenes* (Différenciation *L. monocytogenes* de *L. ivanovii*), une gélose chromogène détectant l'activité de la PIPLC (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C) et l'utilisation du Rhamnose par *L. monocytogenes* a été mise au point par la firme AES Laboratoires (Combourg, France) : ALOA-Confirmation™ et a été validée en 2008 par le CNRL. En 2009, un système d'identification rapide « Rhamnose test » en 6 heures, fondé sur l'utilisation du rhamnose par *L. monocytogenes* et d'un activateur de croissance commercialisé par la firme BioRad (Marnes la Coquette, France), à partir des colonies caractéristiques sur la gélose chromogène Rapid'L. Mono (BioRad) basée sur l'utilisation du xylose et de la PIPLC a été testé.

En étudiant la collection du CNRL et en caractérisant à nouveau les souches historiquement rhamnose négative, seuls 20 souches ont été retrouvées finalement rhamnose négative ou à utilisation lente de ce sucre. Ces souches ont été pour certaines isolées ces dernières années, ce qui a perturbé la conclusion d'identification des laboratoires correspondants. Moins de 1% des souches du CNRL sont rhamnose négatives. Les données de cette étude du CNRL sont en cours d'analyse par les industriels concernés.

### *Evaluation de la puce ADN haute densité de 1<sup>ère</sup> génération d'identification massive de pathogènes en parallèle de la Cellule d'Intervention des risques biologiques*

Pour répondre à des situations de crise sanitaire et d'urgence dans un hôpital, la Cellule d'Intervention des risques biologiques a développé une méthode d'identification rapide en 10 h après amplification. Il s'agit d'une puce de reséquençage destinée à la détection massive de pathogènes. Sur un jeu de souches de référence et isolées en routine, il s'est avéré que la puce ADN arrivait à bien identifier le genre *Listeria*, mais pas l'espèce. Une deuxième génération de puce à ADN est en cours de développement.

### 2.1.6. Développement de nouveaux outils de typage moléculaire et étude de la diversité des *Listeria*

#### *Macrorestriction d'ADN de L. monocytogenes par PFGE avec l'enzyme de restriction SmaI*

Lors de comparaison des souches où l'interprétation des profils de macrorestriction d'ADN obtenus avec les enzymes *AscI* et/ou *ApaI* est difficile (1 bande de différence en moins ou une bande de taille moindre), une macrorestriction d'ADN est effectuée avec l'enzyme de restriction *SmaI* depuis 2004. Une collaboration entre le CNR *Listeria* et les CDC d'Atlanta a permis d'établir un protocole international standardisé pour l'utilisation de l'enzyme *SmaI* en PFGE. La macrorestriction d'ADN par la combinaison des enzymes *AscI*, *ApaI* et *SmaI* constitue un outil de typage moléculaire très discriminant par rapport aux schémas à deux enzymes et a déjà démontré son utilité dans l'étude fine de signalements.

L'utilisation de l'enzyme de restriction *SmaI* permet de dissocier ou non les souches lors d'une enquête sur un signalement ou une épidémie où une différence d'une bande a été observée pour les profils *AscI* ou *ApaI*. Quand les souches de *L. monocytogenes* sont étroitement liées géographiquement et temporellement, l'utilisation de 3 enzymes de restriction fournit un outil de différenciation efficace.

#### *Etude in silico des CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) de L. monocytogenes*

Les CRISPRs consistent en la succession de régions très bien conservées (DR) dont la taille varie de 23 à 47 pb, séparées par des séquences uniques d'une taille similaire et ayant une origine phagique. Le polymorphisme observé entre différentes souches de la même espèce fait du CRISPR un marqueur génétique intéressant pour des analyses comparatives de souches bactériennes très proches et pour des études phylogénétiques intra-espèce comme c'est le cas pour *Mycobacterium paratuberculosis*.

L'étude *in silico* des CRISPRs a consisté en l'exploration bioinformatique des génomes disponibles de *L. monocytogenes* (20 génomes complets privés et publiques (représentants les sérotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4a, 4b, 4c)). Trois CRISPRs d'intérêt ont été identifiés et 2 familles de gènes *cas*. Contrairement à ce qui est observé pour *Salmonella*, il semble que la variabilité inter-souche soit trop faible pour que l'étude des locus CRISPR puisse servir au typage des souches de *Listeria*.

#### *Analyse de la structure des populations de L. monocytogenes sur un échantillonnage mondial par Multilocus Sequence Typing of Listeria*

Le Multilocus Sequence Typing (MLST) combine un pouvoir discriminant élevé pour de nombreuses espèces microbiennes et génère des données standardisées qui sont utiles pour l'étude de la phylogénie des souches et de leur évolution. Nous avons construit une base de données MLST pour 7 gènes de ménage (*abcZ*, *blgA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh*, *lhkA*) à partir d'une

sélection de 178 souches non reliées épidémiologiquement provenant du CNRL et du CCOMS des *Listeria*.

La MLST procure des informations cruciales quant aux relations phylogénétiques entre les souches, alors que les données de PFGE ne donnent pas d'information phylogénétique et les souches appartenant à des complexes clonaux uniques ne sont d'ailleurs pas nécessairement regroupées sur la base de la PFGE.

L'ensemble des données rassemblées a également permis de constituer la première 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 de nouveaux travaux collaboratifs dans le domaine de l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria* sont en cours.

En 2009 et 2010, les résultats de typage par MLST sur des souches françaises ont été comparés à ceux de la MLST sur 300 souches mondiales provenant du souchier du CCOMS des *Listeria*. Les résultats obtenus montrent un profil de diversité similaire à celui qui avait été initialement décrit en France. En effet, la structure des populations de ces souches mondiales est similaire à celle obtenue pour les souches françaises. *L. monocytogenes* semble donc montrer une diversité clonale homogène, indiquant un taux élevé de dispersion à l'échelle mondiale.

En 2010, le CNRL a complété son schéma MLST en y adjoignant des gènes de virulence pour obtenir un schéma de MvLST.

Le CNR a présenté à l'ECDC et au réseau européen des LNR *Listeria monocytogenes* la MLST comme outil d'étude de circulation de souches et d'identification rapide des complexes clonaux à l'origine des épidémies.

#### *La diversité environnementale des Listeria : Projet Transversal de Recherche CNRL/LNR*

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.

Un projet transversal (IP/ANSES) de recherche entre le CNRL et le laboratoire National de Référence des *L. monocytogenes* (LNR) : « Phylogenetic structure of clones of *Listeria monocytogenes* from clinical food and environmental sources », est financé depuis Avril 2010 pour une période de deux ans.

L'objectif général de ce projet est de tester l'hypothèse que les génotypes de *L. monocytogenes* qui sont les plus fréquents parmi les isolats cliniques ont une capacité accrue à infecter l'homme et causer une listériose, vs. l'hypothèse alternative que des génotypes ne sont pas plus pathogènes, mais sont simplement plus fréquents et répandus dans les aliments.

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.

La stratégie d'étude est la suivante :

- Cartographier les données PFGE disponibles pour 4.000 isolats dans un réseau phylogénétique fondé sur la MST, qui définit la diversité clonale de *L. monocytogenes* ;
- Déterminer la séquence complète de génomes d'isolats représentatifs de familles clonales définies par MLST à partir de différentes origines. Cette stratégie se fonde sur la base exhaustive de données françaises des souches de *L. monocytogenes* d'origine alimentaire et clinique de 2000 à 2009. Une base de données (6.500 souches alimentaires) est hébergée au LNR et une seconde base (18.000 souches humaines et alimentaires) est hébergée au CNRL. Ces bases de données contiennent des sources d'informations sur les isolats parmi lesquelles (pour un sous-ensemble d'isolats) les données PFGE obtenues avec les enzymes *AscI* et *ApaI*.

### **2.1.7. Etude de la résistance aux antibiotiques**

#### *Etude longitudinale*

En 2007, le CNRL en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques a entrepris de synthétiser les données sur la sensibilité des *L. monocytogenes* à 23 antibiotiques d'intérêt clinique pour l'ensemble des souches résistantes isolées de patients depuis 1921 (description des différents profils de sensibilité, des données de typage moléculaire existantes, et des mécanismes de résistances caractérisées).

Un total de 61 souches (1,2% des souches analysées de *L. monocytogenes*) était résistant à un ou plusieurs antibiotiques. Les résistances aux tétracyclines (n=34) et fluoroquinolones (n=20) étaient plus présentes et émergent depuis la fin des années 80 et le début des années 90s, respectivement. La résistance aux fluoroquinolones a été attribuée à un efflux actif. La résistance aux tétracyclines est codée par *tet(M)*, vraisemblablement porté par un transposon conjugatif dans 14 souches qui portaient le gène *int*. Nous avons aussi détecté le premier isolat humain avec une résistance à un haut niveau au triméthoprim, associé au gène *dfrD*. Bien qu'aucune souche résistante à la pénicilline n'ait été identifiée, les MICs ont significativement augmenté depuis 1926 avec des valeurs supérieures à 2 µg/mL.

*L. monocytogenes* n'a donc pas acquis de résistance significative aux antibiotiques. Il est notable qu'aucune émergence ou extension de la résistance aux antibiotiques de référence du traitement de la listériose n'a été observée. Cependant, l'augmentation significative des MICs de la pénicilline et la description d'une souche résistante au triméthoprim renforcent la nécessité

d'une surveillance et sont en faveur de la détermination systématique de la sensibilité aux antibiotiques incluant la détermination des MICs de la pénicilline.

Ces résultats vont également permettre d'établir les recommandations et les références EUCAST pour *Listeria monocytogenes*.

### **2.1.8. Evaluation de nouvelles thérapeutiques**

#### *Activités comparées de la moxifloxacinine et de l'amoxicilline contre la croissance intracellulaire de Listeria monocytogenes*

La moxifloxacinine, une fluoroquinolone de dernière génération, présente des propriétés intéressantes contre les bactéries à Gram négatif, mais également sur les bactéries à Gram positif, comme *L. monocytogenes*. Afin d'évaluer l'efficacité de la moxifloxacinine contre *L. monocytogenes*, nous avons mené une approche épidémiologique, puis une approche expérimentale. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de la moxifloxacinine a été déterminée à partir d'un échantillon de souches de *L. monocytogenes* d'origines variées. In vitro, nous avons comparé l'activité de la moxifloxacinine à celle de l'amoxicilline sur les formes extracellulaires de *L. monocytogenes* (en milieu liquide) ; puis, dans un modèle de cultures primaires de cellules de moelle osseuse de souris BALB/c infectées par *L. monocytogenes*.

#### *Efficacité de la moxifloxacinine dans les infections du système nerveux central par Lm*

La moxifloxacinine présente une activité bactéricide *in vitro* sur les formes extracellulaire et intracellulaire de *L. monocytogenes*. Nous avons évalué l'activité *in vitro* et *in vivo* de la moxifloxacinine afin d'évaluer l'intérêt de son utilisation dans le traitement des infections neuro-méningées par *L. monocytogenes*. La moxifloxacinine présente une CMI médiane de 0.5 µg/ml [0.064-1] quelle que soit l'origine des souches testées. Aucune résistance croisée n'a été détectée avec des souches résistantes à la ciprofloxacine. *In vitro*, en milieu liquide, la moxifloxacinine et l'amoxicilline sont bactéricides. Cependant la moxifloxacinine est rapidement efficace dès les premières heures. De plus, elle apparaît rapidement bactéricide sur les bactéries intracellulaires alors que l'amoxicilline n'est que bactériostatique. L'ensemble de ces données suggère que la moxifloxacinine constitue une alternative de choix dans le traitement des listérioses neuro-méningées. Néanmoins, la modification de l'AMM de la moxifloxacinine du fait de sa toxicité a réduit l'intérêt de cette molécule en pratique clinique.

#### *Modification de la pharmacocinétique d'un antibiotique due à l'infection par L. monocytogenes*

L'objectif de cette étude était d'étudier le profil pharmacocinétique de la moxifloxacinine dans un modèle murin présentant une infection cérébrale par *L. monocytogenes*. Le dosage de la moxifloxacinine utilise une méthode CLHP en phase inverse, couplée à une détection spectrofluorimétrique. Cette technique a été mise au point et validée pour des prélèvements d'origine plasmatique et cérébrale.

Le dosage de la moxifloxacine a permis de montrer sa diffusion cérébrale, mais également des modifications pharmacocinétiques en cas d'infection par *L. monocytogenes*.

### *La fosfomycine*

La fosfomycine est inefficace *in vitro* sur *L. monocytogenes*. Cependant, les formes intracellulaires de la bactérie expriment sous contrôle du gène de virulence *prfA* un transporteur membranaire Hpt nécessaire à son métabolisme intracellulaire qui restaure une sensibilité normale à la fosfomycine. Dans un modèle murin d'infection, la fosfomycine, qui n'est jamais testée en pratique compte tenu de la résistance naturelle *in vitro* de *L. monocytogenes* à cette molécule, réduit de plus de 4 Log les charges bactériennes des animaux inoculés avec une dose subléthale de bactéries. L'intérêt de cet antibiotique qui agit en synergie avec les bêta-lactamines, et traverse les barrières hémato-encéphalique et placentaire n'a pas été encore étudié chez l'homme.

## **2.2. Contribution à la surveillance épidémiologique ou à l'alerte**

*Afin de faciliter la lecture de ce rapport, la description du système de surveillance français de Listeria et de la listériose est décrite en Annexe B [à la fin de ce dossier].*

### **2.2.1. Données de la surveillance microbiologique de la listériose humaine**

#### **2.2.1.1. Cas de listériose en France**

Les cas de listériose sont classés en listériose materno-néonatale et listériose non materno-néonatale selon les définitions suivantes :

- Un **cas de listériose materno-néonatale** est un cas où *L. monocytogenes* est isolée d'une culture d'un site physiologiquement stérile chez la femme enceinte, ou de prélèvements périnataux effectués à la naissance ou chez le nouveau-né ( $\leq 28$  jours). La mère et l'enfant comptent alors pour un seul cas.
- Un **cas de listériose non materno-néonatale** est un cas de listériose où une souche de *L. monocytogenes* est isolée d'un site physiologiquement stérile, chez un adulte (femme enceinte exclue) ou plus rarement chez un enfant ( $> 28$  jours).

On distingue les cas sporadiques et les cas épidémiques. Lorsqu'il y a émergence d'un clone, c'est à dire augmentation du nombre de cas dus à des souches présentant les mêmes caractéristiques microbiologiques (sérovar ou groupe PCR et profils de macrorestriction d'ADN), suffisante pour nécessiter une information médiatique des populations à risque, les cas sont dits épidémiques. La notion de cas sporadiques définie ici, englobe donc nécessairement des cas groupés en petit nombre pour lesquels des investigations épidémiologiques et

microbiologiques ont été entreprises, sans qu'un lien entre les cas ne puisse être établi ou lorsqu'un lien a été suspecté, la preuve d'une source commune ne puisse être formellement établie.

Le système de surveillance de la listériose du CNRL se fonde sur l'étude des souches adressées volontairement par les biologistes. Il s'agit donc d'un système passif, non exhaustif. Cependant le nombre d'isolats reçus au CNRL est très voisin du nombre de cas déclarés dans le cadre de la déclaration obligatoire et démontrant donc la quasi-exhaustivité du recueil des souches cliniques. Le présent bilan concerne tous les cas pour lesquels le prélèvement positif à *L. monocytogenes* a été effectué entre 2006 et 2010 et la souche caractérisée par le CNRL. Ceci inclut donc des souches reçues au cours du premier trimestre 2011 compte tenu des délais d'acheminement des souches au CNRL.

[Les données 2006-2009 ont été résumées, car elles ont été présentées dans les rapports d'activités antérieurs.](#)

#### **2.2.1.2. Analyse globale des cas de listériose**

##### *Nombre total de cas*

**Entre 2006 et 2010, le CNRL a reçu 1701 souches (2010 : 343 souches) représentant en fait 1508 cas (2010 : 307 cas) de suspicion de listériose. La différence observée s'explique par l'existence de doublons/ triplicats de souches par patient, non pris en compte dans l'analyse finale.**

Entre 2006 et 2010, les échantillons biologiques (LCR, sérum) adressés au CNRL dans le cadre de suspicion de listériose, dont le diagnostic n'entre pas dans le cahier des charges du CNRL, ont été transférés au service de microbiologie de l'hôpital Necker-Enfants Malades). Cependant, 6 selles avec suspicion de présence de *L. monocytogenes* ont été expertisées par le CNRL et trois se sont révélées positives à *L. monocytogenes*. En 2010, aucun échantillon biologique n'a été expertisé.

**Au total, entre 2006 et 2010, le CNRL retient donc 1491 cas de listériose (2010 : 303 cas) au jour du traitement statistique réalisé pour ce dossier de candidature (Elimination des souches confirmées « Non Listeria » ou des tubes cassés à réception).** Ces cas étaient répartis en 1459 cas (2010 : 298 cas) en provenance de France métropolitaine et 32 cas (2010 : 5 cas) en provenance des Départements et Territoire d'Outre-mer (DOM-TOM).

##### *Taux d'exhaustivité (Objectif sollicité par l'InVS pour la mandature 2006-2011)*

La surveillance de la listériose en France est fondée sur la complémentarité de 2 sources de recensement des cas : la notification aux DDASS avec centralisation des informations à l'InVS (Déclaration Obligatoire) et la centralisation du recueil des souches au CNRL sur la base du volontariat d'un réseau de microbiologistes. Depuis 2008, un point a été effectué chaque semestre entre les déclarations obligatoires envoyées par les laboratoires à l'InVS et les souches reçues au CNRL afin de maintenir un taux optimal d'exhaustivité et mobiliser les DASS pour la

récupération des souches dans un objectif épidémiologique. Il a été complété par un système de relance des correspondants par l'InVS et le CNRL.

La complémentarité des 2 systèmes (CNRL/InVS) en 2006 et 2010 a permis **un taux d'exhaustivité de 98%** (2010 : 97%) pour la réception des souches, par rapport à l'ensemble des cas recensés par les 2 systèmes (Figure 4). La relance des biologistes par l'InVS et le CNRL a permis de récupérer des souches de 2010 dont la plus récente a été reçue en Mars 2011. La non-récupération de souches par le CNRL résulte de souches non gardées ou non envoyées par les LABM.

### ***Laboratoires expéditeurs***

Parmi les 1508 souches qui ont été envoyées pour suspicion de listériose entre 2006 et 2010, 1338 (89 % ; 2010 : 268) proviennent de laboratoires hospitaliers et 170 (11 % ; 2010 : 39) de laboratoires privés.

- Le délai moyen entre la date du prélèvement ayant abouti à l'isolement de la souche et la réception de cette souche au CNRL a été de 11 jours (2010 : 10 jours) entre 2006 et 2010 [compris entre 1 et 291 jours] (Figure 2).

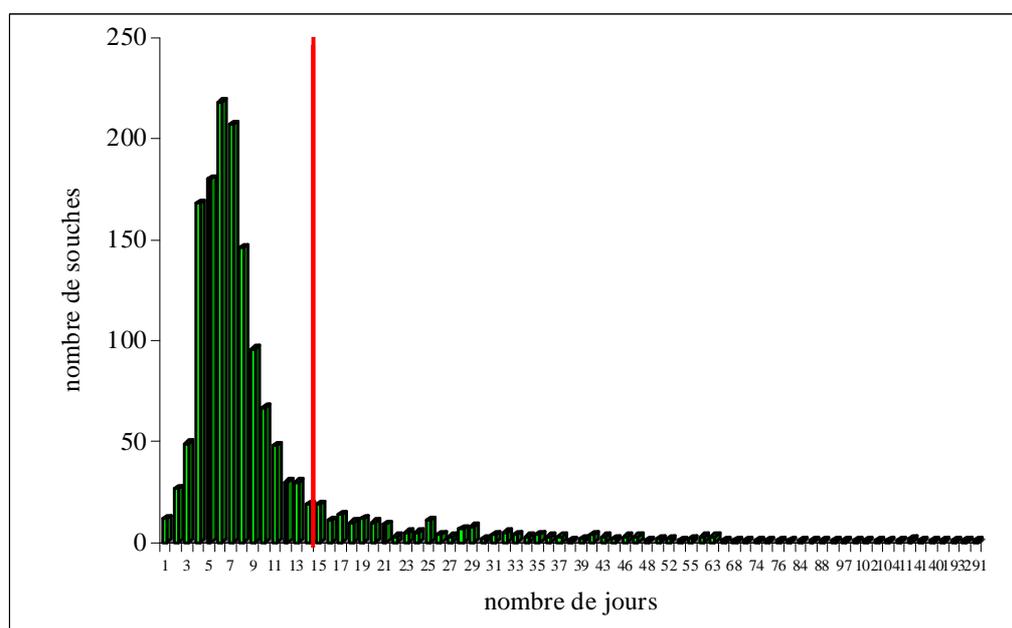
Ce délai qui reste élevé entre isolement de la souche et sa réception au CNRL est lié aux difficultés du transport des souches ou des produits biologiques vers le CNR, surtout par le réseau postal. Pour éviter son allongement, le réseau CNRL-InVS-ARS effectue les relances nécessaires de façon coordonnée pour l'envoi des souches par nos correspondants. La dégradation constatée depuis 2009 provient de ce que lors d'identification douteuse à l'espèce *monocytogenes* le laboratoire pousse les investigations afin d'effectuer ou non la DO alors qu'il pourrait directement envoyer la souche au CNRL pour confirmation ou infirmation de l'identification. La négociation avec un transporteur d'échantillons de laboratoire qui a bien voulu créer un service de collecte des souches humaines vers les CNRs de l'Institut Pasteur maintient cependant des délais raisonnables d'acheminement au CNRL. Cependant ce transporteur n'a pas comme client l'ensemble des laboratoires d'analyses médicales français.

- Le délai moyen entre réception de la souche au CNRL et envoi du rapport d'essai (contenant les résultats d'identification biochimique et la détermination du sérovar ou du groupe PCR) a été de 9 jours entre 2006 et 2010 (2010 : 8 jours) [compris entre 1 et 83 jours (Figure 3)]. La sérotypie ayant été remplacée en Février 2005 par le groupage par PCR multiplex, il était attendu que ce délai diminue. Compte tenu du protocole mis en place par le CNRL et du jour de la semaine où la souche est reçue au CNRL, le délai maximal jugé « normal », entre la réception de la souche et l'envoi du compte-rendu d'analyses est de 12 jours (compte-tenu des différentes étapes analytiques). Le respect de ces délais et voire leur optimisation est une priorité du CNRL. Pour 91% des souches entre 2006-2010 (2010 : 95%), le compte-rendu d'analyses a été envoyé dans des délais normaux. Les dépassements du délai maximal sont dus dans la majorité des cas à la contamination de la souche envoyée, à des difficultés dans la caractérisation de certaines souches, au calendrier des jours ouvrés ou à une nouvelle demande de caractériser les souches non *Listeria* pour confirmation définitive.

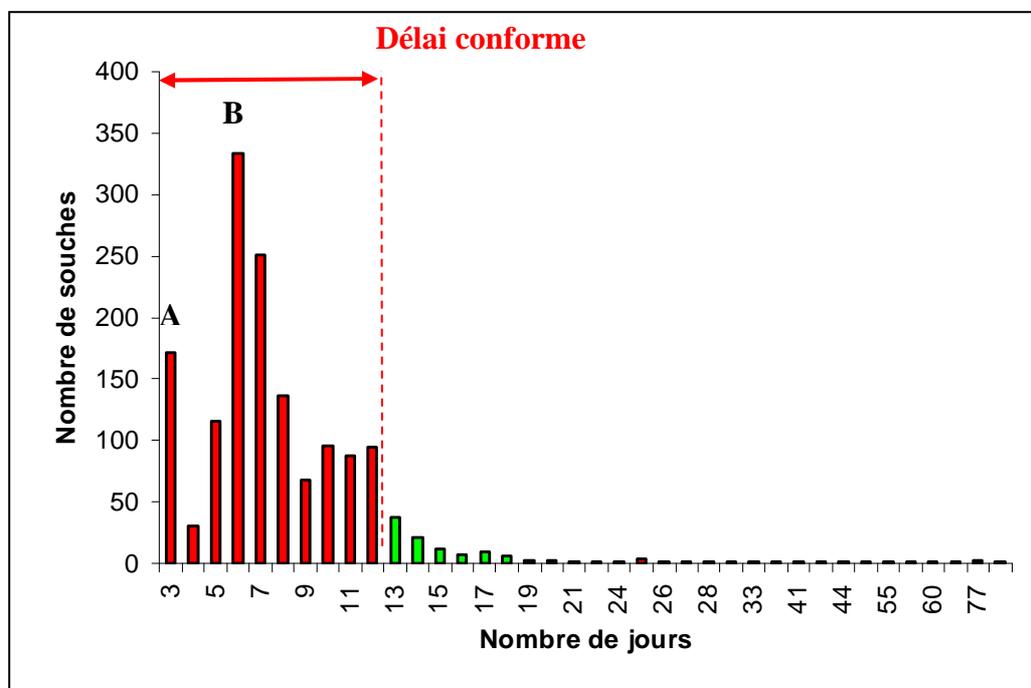
↳ En cas d'urgence ou de demandes de la Cellule *Listeria*, le délai moyen en 2010 entre la réception de la souche au CNRL et la communication des résultats à la Cellule *Listeria* est de 2 jours pour le résultat de groupage PCR effectué sur le premier quadrant de l'isolement de la souche réceptionnée contre 3 jours en routine et de 5 jours pour les résultats de macrorestriction d'ADN contre 12 jours en routine. Le CNRL a eu recours à ces analyses accélérées à la demande de l'InVS. Elles sont confirmées par une analyse de référence réalisée en parallèle.

L'ensemble de ces résultats montrent la stabilité du réseau de microbiologistes constitué par le CNRL ainsi que la prise de conscience par les biologistes des enjeux de santé publique et de leur place essentielle dans la surveillance microbiologique de la listériose, qui est fondée sur le recueil des données issues de leur laboratoire. Cependant, la question du coût de l'envoi des souches, commune à d'autres CNRs, semble pouvoir constituer un frein à l'envoi des souches au CNRL.

**Figure 2 :** Distribution des souches d'origine humaine isolées entre 2006 et 2010 selon le délai entre le prélèvement et la réception au CNRL (en rouge, la médiane).



**Figure 3** : Distribution des souches isolées entre 2006 et 2010 selon le délai entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai. En rouge, le délai conforme aux procédures du CNRL (A, pic des rapports d'analyses sur l'identification et le sérotype PCR ; B, pic des rapports d'analyses identification, sérotype PCR et PFGE *AscI/ApaI*).



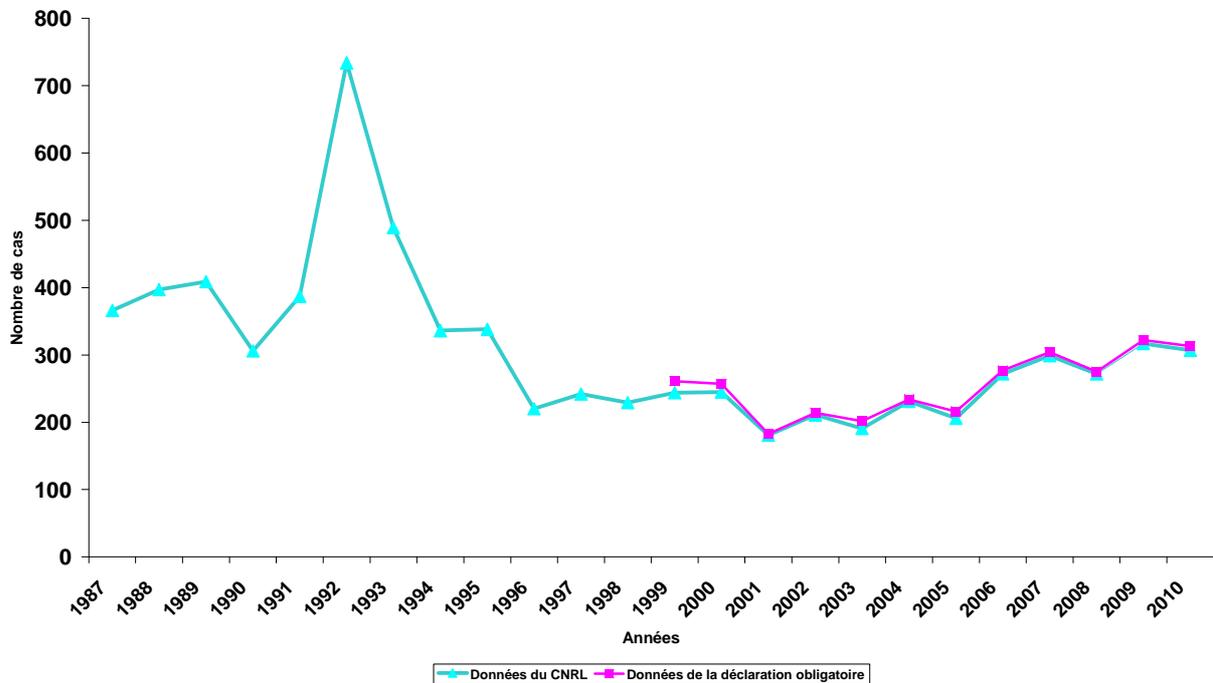
### 2.2.1.3. Cas de listériose en France métropolitaine

Le nombre de cas recensés entre 2006 et 2010 par le CNRL provenant de la France métropolitaine est de 1459 (2010 : 303 cas). Après une augmentation en 2006, observée également dans de nombreux pays européens, le nombre de cas de listériose diagnostiqués entre 2007 et 2010 semble stable (Figures 4 et 5). Notons qu'aucun épisode épidémique n'a été détecté, la dernière épidémie ayant été observée en 2003. Les nombres de cas recensés par le CNRL entre 2006 et 2010 sont les plus élevés depuis 1995.

Entre 2006 et 2010, le taux d'incidence moyen des cas de listériose sporadiques était de 4,6 à 5 cas par million d'habitants (4,6 en 2006 ; 5 en 2007 ; 4,3 en 2008 ; 5 en 2009 et 4,7 en 2010).

Le nombre de souches associées à un signalement de 2006 à 2010 est de 436 (30%) et constant selon les années [100 (29%) en 2006 ; 106 (35%) en 2007 ; 66 (28%) en 2008 ; 87 (27%) en 2009 ; 77 (26%) en 2010]. Le nombre de signalements (11) en 2010 est le même qu'en 2009 et 2006 (2007 : 16 et 2008 : 9).

**Figure 4. Nombre de cas de France métropolitaine recensés par le CNRL et par la Déclaration obligatoire (Source : InVS) entre 2006 et 2010**

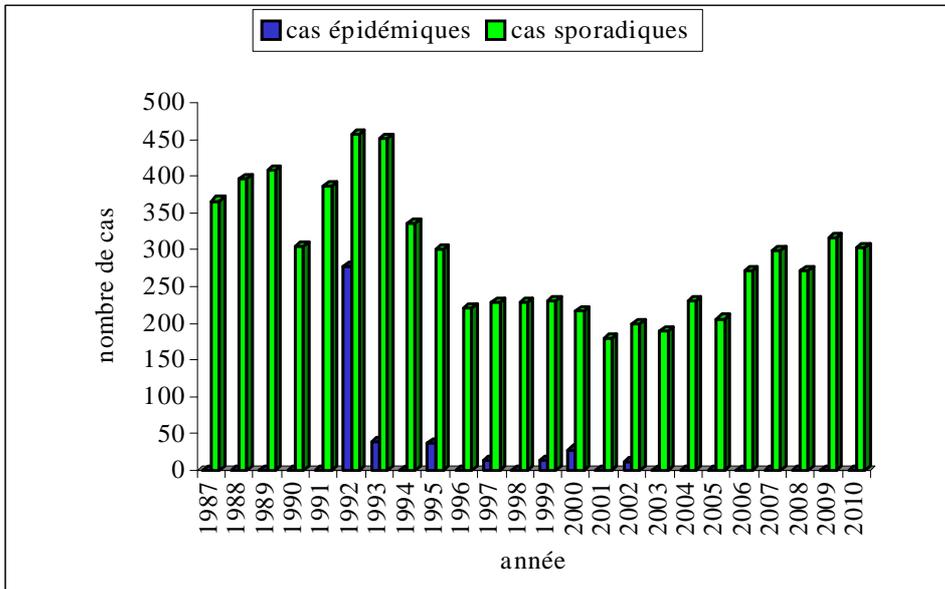


#### 2.2.1.3.1. Distribution temporelle des cas

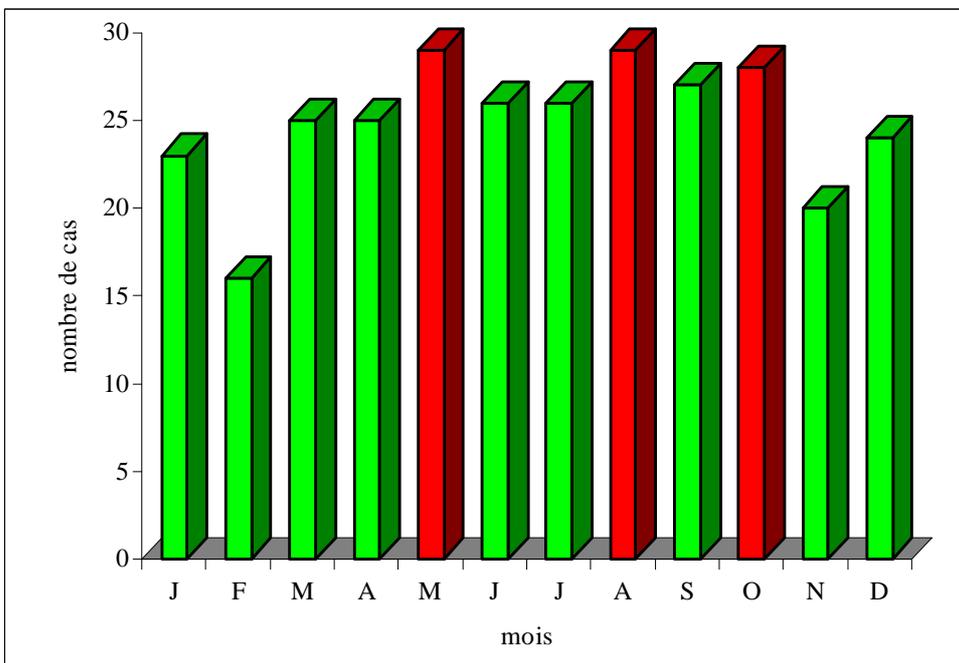
La distribution mensuelle et trimestrielle des cas sporadiques est représentée pour l'année 2010 dans les Figures 6 et 7.

Entre 2006 et 2010, le plus grand nombre de cas a été observé durant le troisième trimestre bien que ceci soit moins marqué en 2010. En 2010, les mois où l'incidence fut la plus forte sont Octobre, Aout et Mai. La distribution temporelle des cas, et notamment des cas groupés, est variable d'une année à l'autre. Cependant, depuis 2006, une augmentation des cas est observée le trimestre d'été avec un pic en Août. Il n'existe pas de véritable variation saisonnière comme pour d'autres microorganismes entéropathogènes. Comme les données européennes le signalent, il existe cependant un certain degré de saisonnalité avec un pic relatif au second semestre.

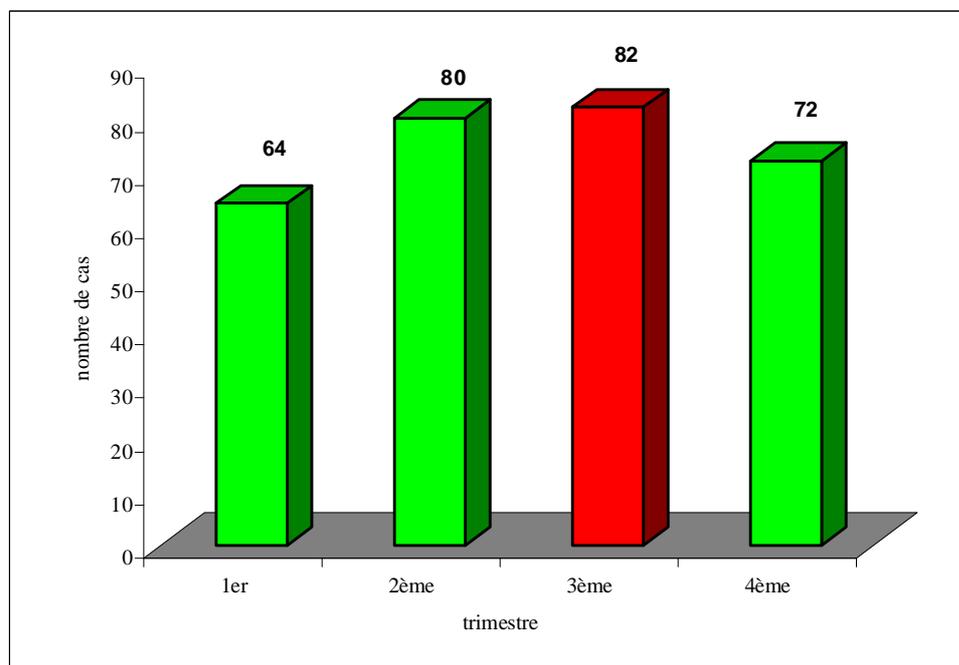
**Figure 5 :** Nombre annuel de cas de listériose en France métropolitaine depuis 1987.



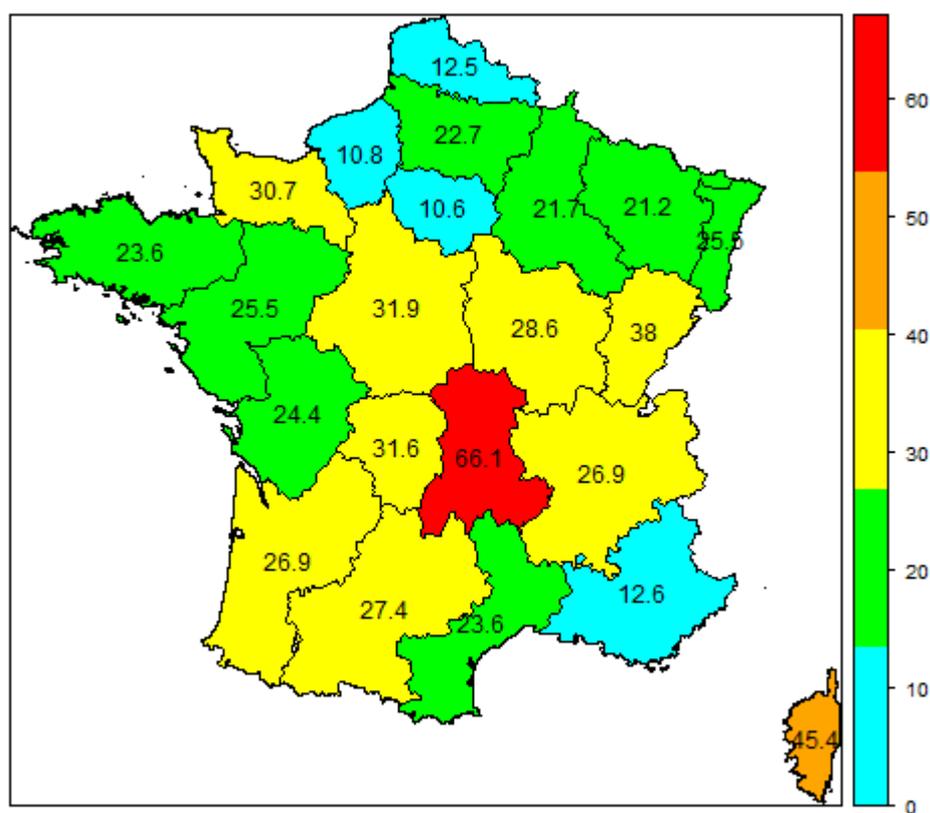
**Figure 6 :** Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2010 (en rouge, les mois avec les plus grands nombres de cas).



**Figure 7 :** Distribution trimestrielle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2010 (en rouge, le trimestre majoritaire).



**Figure 8 :** Incidences régionales globales des cas sporadiques de listériose de 2006 à 2010 (Echelle en cas par 100.000 habitants).



### *2.2.1.3.2. Distribution géographique des cas*

La distribution géographique du nombre de cas et des incidences est représentée dans la Figure 8 et le Tableau 2. Les chiffres d'incidence sont exprimés en cas par 100.000 habitants et sont calculés à partir des chiffres de population évalués par l'INSEE.

#### ***Par région***

- Aucune région n'est caractérisée par une incidence annuelle élevée de façon reproductible d'une année à l'autre de 2006 à 2010.
- Aucune région n'est caractérisée par une incidence très basse d'une année à l'autre de 2006 à 2010.
- L'incidence régionale globale sur les années du mandat (2006-2010), exprimée en cas par 100.000 habitants (Figure 8), montre cependant des disparités régionales avec une incidence maximale en Auvergne, et une relative incidence moindre dans les régions du Nord de la France et en Provence Alpes Côte d'Azur.

#### ***Par département***

- Le département de la Lozère a une tendance à montrer une incidence élevée au cours des années 2006 à 2010.
- Les départements caractérisés par les incidences les plus basses et les incidences nulles sont variables d'année en année entre 2006 et 2010.
- Le département caractérisé par un grand nombre de cas, en valeur absolue, au cours des années 2006 à 2010 est Paris.

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

Région	Année					
	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Alsace	7	8	12	12	7	<b>8</b>
Aquitaine	13	16	32	20	19	<b>20</b>
Auvergne	1	6	8	5	8	<b>5</b>
Basse-Normandie	6	2	10	5	7	<b>9</b>
Bourgogne	5	9	7	7	10	<b>10</b>
Bretagne	13	16	15	14	15	<b>20</b>
Centre	7	11	8	7	16	<b>13</b>
Champagne-Ardenne	3	7	3	7	7	<b>5</b>
Corse	2	4	3	0	0	<b>1</b>
Franche-Comté	4	2	1	1	6	<b>5</b>
Haute-Normandie	5	7	4	6	10	<b>9</b>
Île-de-France	36	42	63	44	58	<b>62</b>
Languedoc-Roussillon	7	10	7	14	17	<b>13</b>
Limousin	1	2	6	2	4	<b>6</b>
Lorraine	11	7	2	8	10	<b>10</b>
Midi-Pyrénées	18	25	17	17	12	<b>8</b>
Nord-Pas-de-Calais	15	11	21	12	15	<b>17</b>
Pays de la Loire	9	11	4	11	9	<b>11</b>
Picardie	3	12	7	6	10	<b>4</b>
Poitou-Charentes	2	6	8	5	9	<b>6</b>
Provence-Alpes-Côte-d'Azur	16	31	19	18	25	<b>15</b>
Rhône-Alpes	18	26	42	47	43	<b>41</b>
<b>Total</b>	<b>202</b>	<b>271</b>	<b>299</b>	<b>268</b>	<b>317</b>	<b>298</b>

#### 2.2.1.3.3. Distribution des cas selon la forme clinique

Les formes cliniques ne sont pas systématiquement indiquées sur la feuille de renseignements accompagnant les souches, elles peuvent alors être obtenues lors d'échanges téléphoniques pour l'obtention d'informations complémentaires, voire dans de rares cas déduites du type de prélèvement.

#### Formes materno-néonatales

Entre 2006 et 2010, 188 formes materno-néonatales ont été enregistrées. Les années 2006 et 2008 ont été caractérisées par le plus faible nombre de cas de formes materno-néonatales depuis 1987 (Tableau 3). Les années 2007, 2009 et 2010 sont similaires en nombre et proportion de cas. Les formes materno-néonatales sont plus fréquemment rencontrées au second semestre des années 2006-2010. Les formes materno-néonatales ont une tendance à la décroissance depuis 1987 plus forte que les formes non materno-néonatales. Cette tendance est peut-être une conséquence des efforts de prévention réalisés en France chez les femmes enceintes.

En 2010, 43 formes materno-néonatales ont été enregistrées, représentant 14 % du nombre total de cas sporadiques pour 2010 (Figure 9). La distribution mensuelle fait apparaître des variations qui suivent le plus souvent la courbe générale des cas sporadiques (Figure 10). La distribution par région est indiquée dans le Tableau 5.

### Formes non materno-néonatales

Entre 2006 et 2010, 1271 formes non materno-néonatales ont été enregistrées, soit 87 % du total des cas sporadiques. En 2010, 255 formes non materno-néonatales ont été enregistrées. Le Tableau 3 indique la répartition de ces formes non materno-néonatales.

**Tableau 3.** Répartition des formes cliniques de 2006 à 2010.

	2006	2007	2008	2009	2010	Total
<b>Formes non materno-néonatales</b>						
Septicémies	170 (71%)	180 (69%)	152 (63%)	170 (62%)	156 (61%)	<b>828</b>
Infections du système nerveux central	54 (22%)	69 (26%)	70 (29%)	85 (31%)	73 (29%)	<b>351</b>
Autres formes	16 (7%)	12 (5%)	19 (4%)	19 (7%)	26 (10%)	<b>92</b>
<b>Total</b>	<b>240</b>	<b>261</b>	<b>241</b>	<b>274</b>	<b>255</b>	<b>1271</b>
<b>Formes materno-néonatales</b>						
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>42</b>	<b>27</b>	<b>45</b>	<b>43</b>	<b>188</b>
<b>Total des formes cliniques</b>	<b>271</b>	<b>303</b>	<b>268</b>	<b>319</b>	<b>298</b>	<b>1459</b>

- **Le nombre absolu d'infections du système nerveux central entre 2006 et 2010 est en augmentation par rapport aux années précédentes pour atteindre 70 à 80 cas par an des formes non materno-néonatales.** Ce nombre était assez stable depuis 2000, entre 40 et 60 cas/an (Figures 11 et 12). La proportion reste, elle, assez stable, aux alentours de 30%. Depuis 2008, le nombre de cas est voisin de ceux observés avant 1995. **Ce sont ces formes cliniques et les septicémies (voir plus bas) qui ont le plus augmenté depuis 2006.**

- **Le nombre de formes septicémiques, après une augmentation depuis 2005 et 2008 est en légère baisse en 2010.** Ce sont ces formes cliniques qui avaient le plus contribué à l'augmentation globale du nombre de cas observé en 2006 et en 2007.

- Les **formes cliniques « autres »** correspondent à des atteintes focales et représentent de 4 à 10% des cas non materno-néonatales entre 2006 et 2010. En 2010, le nombre de cas est le plus important depuis 2006. Le CNR a présenté en 2009