

Rapport Annuel d'Activité

2017

Centre National de Référence
des *Listeria*

Année d'exercice
2016

RESPONSABLE :	Marc LECUIT
RESPONSABLE ADJOINT :	Alexandre LECLERCQ
INGENIEUR :	Mylène MAURY
MEDECIN CHERCHEUR :	Caroline CHARLIER-WOERTHER
TECHNICIENS :	Hélène BRACQ-DIEYE Pierre THOUVENOT Guillaume VALES Nathalie TESSAUD-RITA
ASSISTANTE :	Marie-Claire ROZIER

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, C. Charlier-Woerther, M.M. Maury et M. Lecuit. 2017. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des *Listeria* – Année 2016. Institut Pasteur, Paris, France) dont elles sont issues.

Avant-propos

Le Centre National de Référence des *Listeria* remercie l'ensemble de ses correspondants pour l'envoi en 2016 des souches et de leurs informations associées, dans le cadre de la surveillance microbiologique de la listériose en France.

Le trait dans la marge gauche dans les annexes indique le texte révisé en 2016.

RESUME DE L'ANNEE 2016

En 2016, le nombre total de souches humaines et non humaines réceptionnées au Centre National de Référence *Listeria* (CNRL), hors projets de recherche, a diminué de 12% (1719 souches), avec une diminution de 12% du nombre de souches humaines (407). Le CNR a caractérisé et typé l'ensemble de ces souches dans le cadre de la surveillance microbiologique de la listériose (Annexe A). Ces activités ont été effectuées en conformité avec son accréditation COFRAC (Attestation d'accréditation N°8-2588) selon la norme NF EN ISO 15189.

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 2016, une épidémie de 22 cas liée à la contamination d'un fromage (Reblochon), la plus importante depuis 2000, a été investiguée avec les autorités.

En 2016, 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 des programmes TESSY (The European Surveillance System) et ELITE (European *Listeria* Typing Exercise) de surveillance microbiologique moléculaire européenne. Le CNRL / CC-OMS *Listeria* a participé à l'investigation de 6 épidémies.

Le CNRL participe à la détection des cas groupés et à l'identification de la source de contamination, en lien avec Santé Publique France (SPF) et les autres partenaires de la cellule *Listeria*. En 2016, le CNRL a validé la méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des *L. monocytogenes* et a publié la méthode de typage fondée sur l'étude du core génome de *Listeria monocytogenes* (core genome MultiLocus Sequence Typing) qu'il a développé et validé. Il a réalisé avec SPF une étude prospective comparant cgMLST et PFGE pendant une période de 2 ans (2015-2016), afin de valider la méthode cgMLST. La comparaison des deux méthodes de typage sur une année démontre les avantages du cgMLST : meilleure discrimination des souches, permettant l'identification de clusters de plus petite taille et une meilleure spécificité par rapport à l'approche PFGE. Le cgMLST est depuis 2017, suite à la réunion de la cellule interministérielle *Listeria*, la méthode de typage pour la surveillance microbiologique de *Lm* en France.

La caractérisation moléculaire des souches par cgMLST permet également d'analyser la biodiversité de l'espèce *Lm*. En 2016, le CNR a publié une étude intégrant données épidémiologiques, génomiques et de virulence, et ainsi pu définir le concept de clones hypervirulents et hypovirulents (1). Le CNRL analyse le génome de souches cliniques, alimentaires et environnementales, pour étudier la biodiversité et l'évolution de *L. monocytogenes*, caractériser l'émergence éventuelle de clones d'intérêt épidémiologique et microbiologique, et mieux comprendre les bases moléculaires de la virulence de *Lm*.

Le CNRL a également mis en place depuis 2009 une étude prospective nationale de la listériose, en lien avec SPF. Les données de ce travail ont été publiées en Janvier 2017 (Etude MONALISA) (2): elles soulignent la gravité de l'infection (mortalité des formes septicémiques à 40%, décès ou séquelles rapportées chez 69% des patients avec encéphalites). De nouveaux facteurs pronostiques ont pu être identifiés (dont monocytopénie et néoplasie évolutive). Cette étude a montré que la prise de dexaméthasone est associée à une survie réduite en cas de neurolistériose. L'administration de betalactamine active, d'aminoglycoside et de cotrimoxazole est associée à une survie accrue dans les formes non materno-néonatales. Le CNRL contribue également à un projet collaboratif avec la Faculté Vétérinaire de Bern (Suisse) sur la comparaison des listérioses humaines et animales (étude Sinergia financée par le fonds national suisse de la recherche scientifique).

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. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNRL.....	7
1.1. LES MISSIONS SPECIFIQUES DU CNRL	7
1.2. ORGANISATION DU CNRL.....	8
2. ACTIVITES D'EXPERTISE.....	9
2.1. EVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2016.....	9
2.1.1. <i>Techniques développées ou en développement en 2016.....</i>	<i>9</i>
2.1.2. <i>Travaux d'évaluation des techniques, troussees disponibles dans le commerce à visée diagnostique.....</i>	<i>10</i>
2.1.3. <i>Méthodes transférées vers d'autres laboratoires.....</i>	<i>10</i>
2.2. SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE HUMAINE EN FRANCE.....	11
2.3. CARACTERISATION DES SOUCHES D'ORIGINE NON HUMAINE REÇUES AU CNRL	25
2.4. PARTICIPATION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE	30
2.4.1. <i>Contribution à la surveillance nationale.....</i>	<i>30</i>
2.4.2. <i>Contribution à la surveillance alimentaire.....</i>	<i>33</i>
2.4.3. <i>Alerte sur les résistances atypiques aux traitements de référence.....</i>	<i>34</i>
2.4.4. <i>Alerte Infections nosocomiales.....</i>	<i>34</i>
2.4.5. <i>Interface avec les acteurs nationaux.....</i>	<i>34</i>
2.5. CONTRIBUTION AUX RESEAUX EUROPEENS ET INTERNATIONAUX DE SURVEILLANCE	35
3. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE ET ALERTE	37
3.1. SUSPICIONS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES.....	37
3.2. DEMANDE DES ARS ET CIRE	37
3.3. DEPASSEMENTS DE SEUILS PFGE	37
3.4. CLUSTERS CGMLST.....	38
3.5. TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES	40
3.6. EPIDEMIES	40
3.7. ALERTES-PRODUITS DGAL.....	41
3.8. ALERTES PRODUITS DGCCRF	42
3.9. ENQUETES DES FORMES NEUROMENINGEES (ENQUETES « FRIGO »)	42
3.10. «URGENT INQUIRIES» DE L'ECDC	43
3.11. ECHANGE SUR DES ALERTES AVEC D'AUTRES ORGANISMES DE SANTE PUBLIQUE EUROPEEN	44
3.12. ENQUETE JUDICIAIRE	44
4. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	45
4.1. ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS, ACCUEIL DE STAGIAIRES	45
4.2. PARTICIPATION A LA REDACTION DE COMMUNICATIONS ECRITES DIDACTIQUES.....	45
4.3. RETOUR D'INFORMATIONS.....	45
4.4. SITE INTERNET	46
4.5. VEILLE INTERNET	46
4.6. ACTIVITE DE CONSEIL.....	46
4.7. EXPERTISES	47
5. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNRL.....	48
5.1. CONTRIBUTIONS AUX ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES	48
5.2. METHODES DE DIAGNOSTIC ET CARACTERISATION DES SOUCHES ATYPIQUES.....	51
5.3. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES, MICROBIOLOGIQUES ET CLINIQUES	52
5.4. ETUDES DE LA VIRULENCE	54
5.5. TAXONOMIE	56
5.6. PARTICIPATION A LA MAITRISE AGROALIMENTAIRE	56

5.7.	ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET TOLERANCE AUX BIOCIDES	56
5.8.	PUBLICATIONS NATIONALES.....	57
5.9.	PUBLICATIONS INTERNATIONALES	57
5.10.	CHAPITRES DE LIVRES	58
5.11.	COMMUNICATIONS NATIONALES.....	58
5.12.	COMMUNICATIONS INTERNATIONALES	58
5.13.	CONFERENCES SUR INVITATIONS	59
5.14.	MEMBRES DE COMITE D'ORGANISATION OU MODERATEUR DE CONGRES.....	61
5.15.	PRESENCE DANS LES MEDIAS.....	61
6.	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX	62
6.1.	COOPERATION.....	62
6.2.	ECHANGES ENTRE LE CNR ET LE LNR	62
6.3.	PERSPECTIVES.....	62
7.	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2017-2018.....	63
8.	REFERENCES.....	65
	ANNEXE A : LISTERIOSE	68
	ANNEXE B : ORGANISATION DU CNR.....	69
B.1.	PERSONNEL PERMANENT.....	69
B.2.	LOCAUX.....	70
B.3.	EQUIPEMENT	71
B.4.	PLAN DE CONTINUITE.....	72
B.5.	MANAGEMENT DE LA QUALITE ET HYGIENE/SECURITE AU SEIN DU CNRL.....	72
	ANNEXE C : ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR <i>LISTERIA</i>	76
C.1.	METHODES DE REFERENCES ET MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES	76
C.2.	MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE	77
C.3.	MAINTIEN ET DETENTION DES BASES DE DONNEES.....	80
C.4.	TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL	81

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

Abréviation / Acronymes	Dénomination
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANSES-LSA	Laboratoire de Santé animale de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM	Agence National de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARS	Agence Régionale de Santé
CES	Comité d'experts spécialisés
CCOMS	Centre Collaborateur de l'OMS des <i>Listeria monocytogenes</i>
CDC	Center for Diseases Control
CFU	Colonie Formant Unité
cgMLST	Core Genome Multi Locus Sequence Typing
CNRL	Centre National de Référence des <i>Listeria</i>
COM	Collectivité d'Outre-Mer
DG/DCCRF	Direction Générale / Départementale de la Consommation et de la Répression des Fraudes
DGAI	Direction Générale de l'Alimentation
DGS	Direction Générale de la Santé
DG SANTE	Direction Générale de la Santé et du Consommateur
DO	Déclaration Obligatoire
DROM-TOM	Département & Région et Territoire d'Outre-Mer
EFSA	European Food Safety Agency
ELITE	Epidemic Intelligence Information System
EHPAD	Etablissement d'Hébergement pour Personnes Agées Dépendantes
EQA	Essai d'intercomparaison – Essai externe de la qualité
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FWD	Food and Water-borne Diseases
GEA	Gastro-entérite aiguë
Ila	Sérovars 1/2a et 3a de <i>Lm</i>
Ilb	Sérovars 1/2b, 3b et 7 de <i>Lm</i>
Ilc	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
SPF	Santé Publique France
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST	MLST sequence type (in French)
TESSy	European Surveillance System

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

La Direction Générale de la Santé (DGS) a mis en place en 1982 une surveillance nationale de la listériose en créant 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.

L'Institut Pasteur héberge depuis 1993 le Centre National de Référence *Listeria* (CNRL), qui est Centre Collaborateur OMS *Listeria* (CCOMS) depuis 1992. L'Institut Pasteur offre un cadre unique pour héberger le CNRL. Il possède une structure administrative coordonnant l'activité des CNRs placés sous sa responsabilité, et héberge différentes unités de recherche travaillant sur *Listeria* et d'autres entéropathogènes, ainsi que des plateformes technologiques lui permettant un accès privilégié à un large panel de techniques à haut débit et de grande technicité.

Le CNRL est en contact constant avec plus de 750 biologistes français, ainsi que l'ensemble des laboratoires vétérinaires départementaux, la DGCCRF et les laboratoires privés d'hygiène des aliments (environ 260 correspondants).

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

Les responsables du CNRL possèdent respectivement une expertise médicale clinique et microbiologique et une expertise en microbiologie de la chaîne alimentaire et sécurité sanitaire des aliments. En 2007, le CDC d'Atlanta a signalé l'efficacité du modèle français de surveillance de la listériose.

1.1. LES MISSIONS SPECIFIQUES DU CNRL

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

Les expertises spécifiques du CNRL listées dans le cahier des charges pour le mandat 2012-2016 sont les suivantes :

- 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.
- Étudier 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.

Pour assurer la surveillance, le CNRL doit :

- Surveiller toutes les souches issues d'infections humaines invasives ou non (Gastro-entérites aiguës (GEA) de manière la plus exhaustive possible, et détection des cas groupés.
- Étudier 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 SPF de cas groupés et de tout phénomène inhabituel : augmentation du nombre de cas (si dépassement d'un seuil défini en accord avec SPF), 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).
- Contribuer en lien avec SPF aux systèmes de surveillance internationaux notamment européens dans le cadre de la directive zoonoses 2003/99/CE.

1.2. ORGANISATION DU CNRL

L'ensemble de l'organisation du CNR est décrit en Annexe B du présent rapport et n'a pas changé depuis le dossier de candidature pour le mandat 2017-2021.

2. ACTIVITES D'EXPERTISE

La description des techniques disponibles au CNRL est décrite en Annexe B du présent rapport. Cette activité d'expertise a été présentée lors de la visite du CNRL par le Comité des CNRs et SPF en Janvier 2016.

2.1. EVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2016

2.1.1. Techniques développées ou en développement en 2016

DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC

Identification de Listeria par MALDI-TOF

Poster: P. Thouvenot, G. Vales, H. Bracq-Dieye, N. Tessaud-Rita, A. Moura, M. Maury, M. Lecuit, A. Leclercq. 2016. Evaluation du MALDI-TOF mass spectrometry of identification of *Listeria* species. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 64.

Article soumis : P. Thouvenot, G. Vales, H. Bracq-Dieye, N. Tessaud-Rita, A. Moura, M. Maury, M. Lecuit, A. Leclercq. 2016. Maldi-Tof mass spectrometry-based identification of *Listeria* species in surveillance: a prospective study.

Abstract: Identification of *Listeria* species based on culture and phenotypic reference methods is labor-intensive and time-consuming. Thus, fast, reliable and cost-effective methods of identification are needed to improve diagnosis in clinical, veterinary and food production settings. In this study, we assessed the accuracy of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to protein extracts from cultured bacteria for the identification of *Listeria* species.

In total, 517 *Listeria* isolates obtained from human and food samples, including 453 *L. monocytogenes* collected prospectively in the context of routine surveillance, were tested in this study, representing 15 different *Listeria* species. Identification based on MALDI-TOF mass spectrometry was performed using the MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) and confirmed by API-*Listeria* alone or completed by whole-genome sequencing data.

All isolates were correctly identified to the genus level. Unambiguous correct identification to the species level was obtained for 8 species: *L. monocytogenes* (n=453), *L. fleischmannii* (n=3), *L. grayi* (n=10), *L. innocua* (n=14), *L. ivanovii* (n=11), *L. seeligeri* (n=15), *L. weihenstephanensis* (n=1) and *L. welshimeri* (n=10). Unreliable identification was obtained for *L. grandensis* (n=1), *L. rocourtiae* (n=1), *L. aquatica* (n=1), *L. cornellensis* (n=1), *L. riparia* (n=1) and *L. floridensis* (n=1) (low scores of identification). *L. marthii* (n=3) was always misidentified as *L. monocytogenes* (with acceptable scores). However, all the misidentifications and non-identifications were due to the lack of reference profiles for these species in the current database.

This work demonstrates the feasibility of using MALDI-TOF mass spectrometry as a cost-effective and rapid approach for *Listeria* identification in food analysis and medical or veterinary purposes. It also highlights the importance of having an updated and complete database for the correct identification of all *Listeria* species.

Le CNRL avait précédemment testé la méthode MALDI-TOF MS ANDROMAS (3) et est en contact avec bioMérieux, fabricant du système MALDI-TOF MS VITEK, pour connaître les caractéristiques de performance de cette méthode envers l'identification des *Listeria*.

Optimisation de la méthode d'isolement des *Listeria monocytogenes* dans les selles

Pour l'ANSM, SPF et le projet R-GNOSIS, le CNRL est amené à rechercher des *L. monocytogenes* viables dans les selles de patients avec ou sans GEA. Dans le cadre d'expertises pour SPF dans une TIAC dans 2 EHPAD en France, le CNR a amélioré sa technique. Cette amélioration a un effet sélectif sur la flore et favorise la sélection de *Lm*. Ceci a permis d'isoler chez 2 patients *Lm* dans les selles, alors que cette recherche était négative avec la précédente méthode. Cette méthode est en cours de publication et conduira à la production d'un protocole fiable d'isolement dans les selles pour les laboratoires de biologie spécialisée.

DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE TYPAGE MOLECULAIRE

Développement et validation internationale d'une nouvelle méthode de référence de typage moléculaire de *Listeria monocytogenes* : le core-génom MLST (cgMLST)

Poster: A. Moura, A. Criscuolo, H. Pouseele, M. Maury, A. Leclercq, C. Tarr, Jonas T. Björkman, T. Dallman, A. Reimer, V. Enouf, E. Larssonneur, H. Carleton, H. Bracq-Dieye, L. S. Katz, L. Jones, M. Touchon, M. Tourdjman, M. Walker, S. Stroika, T. Cantinelli, V. Chenal-Francisque, Z. Kucerova, E. P. C. Rocha, C. Nadon, K. Grant, E. M. Nielsen, B. Pot, P. Gerner-Smidt, M. Lecuit, S. Brisse. *Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of Listeria monocytogenes*. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 132

Article A. Moura, A. Criscuolo, H. Pouseele, M. Maury, A. Leclercq, C. Tarr, Jonas T. Björkman, T. Dallman, A. Reimer, V. Enouf, E. Larssonneur, H. Carleton, H. Bracq-Dieye, L. S. Katz, L. Jones, M. Touchon, M. Tourdjman, M. Walker, S. Stroika, T. Cantinelli, V. Chenal-Francisque, Z. Kucerova, E. P. C. Rocha, C. Nadon, K. Grant, E. M. Nielsen, B. Pot, P. Gerner-Smidt, M. Lecuit, S. Brisse. 2016. *Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of Listeria monocytogenes*. *Nature Microbiology*, 2:16185 (4).

Abstract: *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a major human foodborne pathogen. Numerous *Lm* outbreaks have been reported worldwide and associated with a high case fatality rate, reinforcing the need for strongly coordinated surveillance and outbreak control. We developed a universally applicable genome-wide strain genotyping approach and investigated the population diversity of *Lm* using 1,696 isolates from diverse sources and geographical locations. We define, with unprecedented precision, the population structure of *Lm*, demonstrate the occurrence of international circulation of strains and reveal the extent of heterogeneity in virulence and stress resistance genomic features among clinical and food isolates. Using historical isolates, we show that the evolutionary rate of *Lm* from lineage I and lineage II is low ($\sim 2.5 \times 10^{-7}$ substitutions per site per year, as inferred from the core genome) and that major sublineages (corresponding to so-called 'epidemic clones') are estimated to be at least 50-150 years old. This work demonstrates the urgent need to monitor *Lm* strains at the global level and provides the unified approach needed for global harmonization of *Lm* genome-based typing and population biology.

2.1.2. Travaux d'évaluation des techniques, trousse disponibles dans le commerce à visée diagnostique

Dans le cadre de l'étude MONALISA, une biothèque a été constituée pour désormais plus de 1000 malades et 456 témoins. Elle comporte notamment des échantillons de sérum et plasma sur lesquels ces trousse pourront être ultérieurement évaluées.

2.1.3. Méthodes transférées vers d'autres laboratoires

Le CNRL a développé et ouvert au public sa base de données BIGSdb-*Lm* de génomes et profils cgMLST.

2.2. SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE HUMAINE EN FRANCE

A - DEFINITION DES CAS

En France

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

On distingue les cas sporadiques et les cas groupés. Les cas groupés (dus à des souches présentant les mêmes caractéristiques microbiologiques) constituent une épidémie lorsqu'est identifiée la source de contamination alimentaire.

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, démontrant la quasi-exhaustivité du recueil des souches cliniques par rapport aux données de la DO. Le bilan présenté concerne tous les cas pour lesquels un prélèvement positif à *L. monocytogenes* a été effectué en 2016 avec une souche caractérisée par le CNRL. Ceci inclut donc des souches au CNRL reçues au cours du premier trimestre 2017 compte tenu des délais d'acheminement des souches après la déclaration.

Proposition de modification en Europe

En Octobre 2016, l'ECDC a sollicité le CNRL pour une révision de la définition européenne des cas de listériose en incluant la détection d'acides nucléiques de *L. monocytogenes* comme alternative à l'isolement par une méthode culturale.

B - PIPELINE DE LA RECEPTION DES SOUCHES AU RENDU DE L'EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE

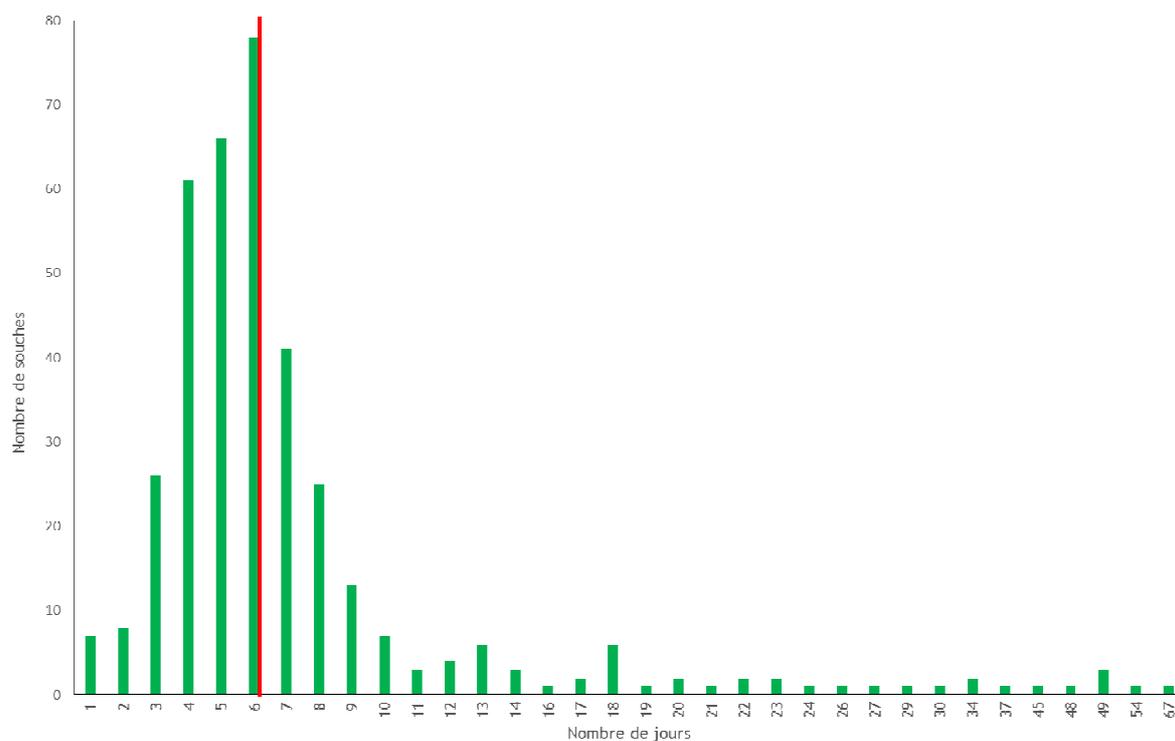
Laboratoires expéditeurs (Réseau)

Les laboratoires expéditeurs (n=380) sont à 84% (82% en 2015) hospitaliers, reflétant la sévérité de l'infection. Les autres structures sont des laboratoires privés (16% ; 18% en 2015). En 2016, le CNRL a reçu 202 souches isolées de patients ou d'aliments qui lui étaient adressées par 3 laboratoires étrangers ou de produits importés pour expertise, dans le cadre des activités de Centre Collaborateur de l'OMS.

Délai identification / réception

Le **délai moyen entre le prélèvement et la réception** des souches au CNRL est de 8 jours (entre 1 et 67 jours) (Figure 1), contre 9,5 jours en 2015. Le raccourcissement de ce délai reflète l'amélioration du management de la qualité concernant la transmission des échantillons et de la sous-traitance entre LABM.

Figure 1. Distribution des souches d'origine humaine isolées en 2016 selon le délai entre le prélèvement et la réception au CNRL (médiane en rouge)



Non-conformité de souches

La détermination de l'espèce *L. monocytogenes* par les laboratoires d'analyse médicale (LABM) repose de manière croissante sur la méthode de spectrométrie de masse (MS) MALDI-TOF. En 2016, le CNRL a validé et établi l'exactitude de la méthode avec le système Bruker Daltonics Microflex et BioTyper au niveau de l'espèce, à l'exception de certaines espèces de *Listeria* décrites après 2009 et jamais isolées en clinique à ce jour. La spectrométrie de masse remplace depuis Aout 2016 la méthode API-*Listeria* (bioMérieux), comme méthode de détermination de l'espèce.

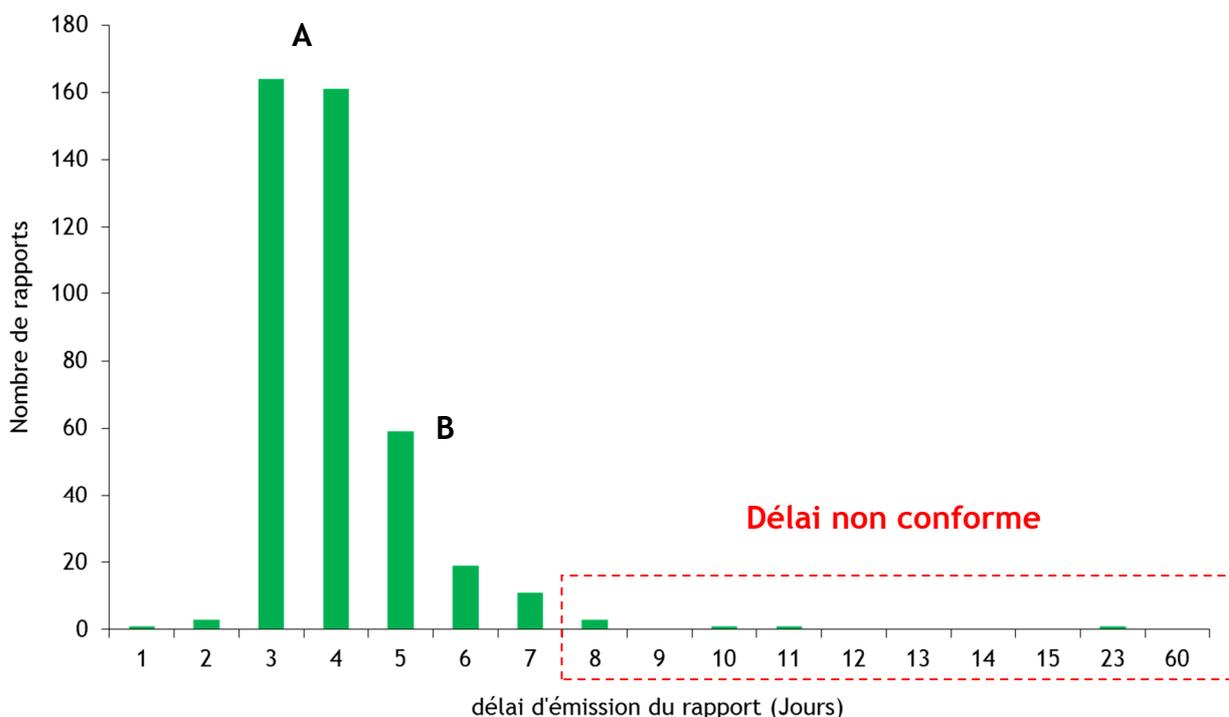
Parmi les souches qui nous ont été adressées en 2016, la détermination de l'espèce était correcte dans 99,7% des cas. Deux souches humaines présumées *L. monocytogenes* ont été ré-identifiées, à la demande d'ARS, comme *Arcanobacterium hemolyticum* et *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Envoi du rapport d'essai

Le **délai moyen entre réception de la souche au CNRL et envoi du rapport d'essai** (incluant l'identification de l'espèce et le groupage PCR) a été de 4,5 jours (6,4 j en 2015) (Figure 2). Le délai cible du système qualité du CNRL est de 4 jours. Le délai peut s'allonger si les souches nous sont adressées après le mercredi (ou en cas de jour férié), décalant la date d'obtention des résultats à la semaine suivante (+3 jours). Ce délai peut également s'allonger en cas de nécessité de purification de la souche ou de tests phénotypiques complémentaires reposant sur l'hydrolyse des sucres sur 5 jours.

Les délais non-conformes (1,5% des souches humaines) étaient liés à des erreurs sur la lecture des renseignements manuscrits, à des difficultés techniques ou à l'identification de bactéries non *Listeria*.

Figure 2. Distribution des souches isolées en 2016 selon le délai entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai (A, rapports d'analyses sans week-end ; B, rapports d'analyses avec week-end et jours fériés)



C - ANALYSE GLOBALE DES CAS DE LISTERIOSE

Nombre total de cas

- En 2016, le CNRL a reçu 407 souches humaines (458 en 2015) rattachées à 363 suspicions d'infections humaines déclarées (413 en 2015). La différence observée entre nombres de souches et de cas est liée à l'existence de doublons voire triplicats de souches (n=43) par patient, non pris en compte dans l'analyse finale.

Le CNR a investigué 17 selles dans le cadre du programme R-GNOSIS et de l'investigation d'une TIAC en EHPAD. L'investigation des patients d'EHPAD a permis dans deux cas l'isolement de *L. monocytogenes* dans des selles : ces cas sont ajoutés aux cas français.

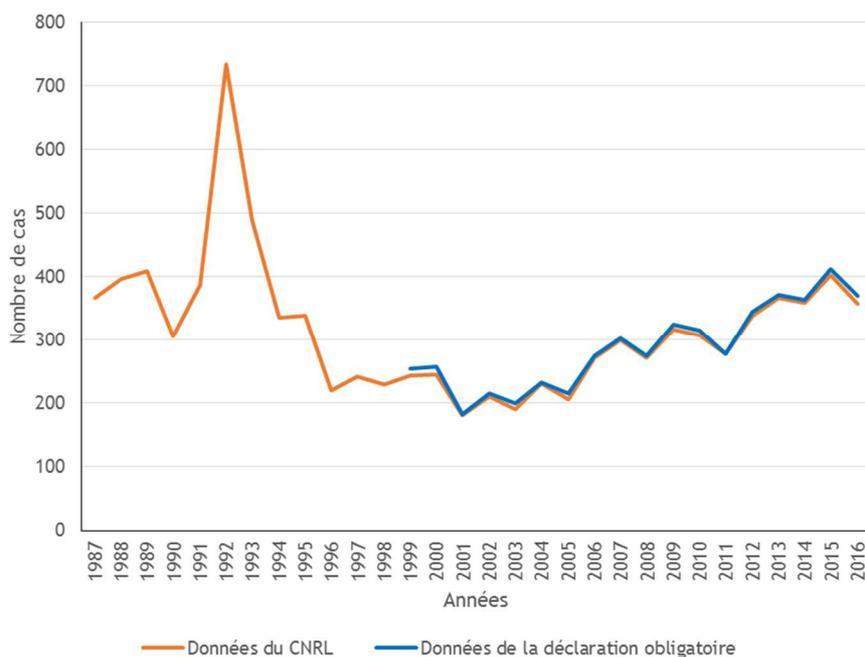
Ainsi, en 2016, le CNRL retient donc, après recoupement des données de SPF, 363 cas de listériose à *Listeria monocytogenes* (413 en 2015, soit une diminution de 12%) au jour du traitement statistique de ce rapport. La différence de 13 cas par rapport à SPF est due à : 10 cas sans souche associée à la DO (car non conservées par les laboratoires) ; 2 cas où la qPCR sur LCR était positive, sans souche isolée ; 1 cas d'une souche anglaise non reçue au CNRL. Il y a eu 357 cas en France métropolitaine et 6 dans les DROM-TOM.

L'incidence de la listériose depuis 1992 en France a suivi différentes phases, observées également en Europe :

- Diminution importante dans les années 1990 de 700 à environ 400 cas par an.
- Augmentation progressive depuis 2006 sans cause unique identifiée (au niveau du profil des souches, de la contamination alimentaire de la population ou du profil des patients) (Figure 3) (5).

L'incidence de la listériose humaine était de 5,6 cas par million d'habitants en 2016. Elle est similaire à celle notée en 2013 et 2014 et plus faible qu'en 2015, où l'incidence était la plus élevée observée depuis la mise en place du système de surveillance français : 6,2 cas par millions d'habitants.

Figure 3. Nombre de cas recensés en France métropolitaine par le CNRL et par la Déclaration Obligatoire (Source : SPF) entre 1987 et 2016



Taux d'exhaustivité

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

Le taux d'exhaustivité de réception des souches par rapport à l'ensemble des cas recensés est de 96,5% en 2016 (98,7% en 2015) (Figure 3). Parmi les systèmes de surveillance européens de la listériose, la France présente l'un des taux d'exhaustivité les plus élevés, rendant possible des analyses épidémiologiques et microbiologiques de qualité.

NB. Les données de Santé Publique France obtenues par technique de capture / recapture sur les systèmes de surveillance de la listériose et Epibac (surveillance des infections invasives) de 2008 à 2013 a permis d'évaluer récemment l'exhaustivité de la déclaration obligatoire en France entre 85 et 87% (Cf. Chapitre 5.1.).

Cas de listériose dans les DROM-TOM-COM

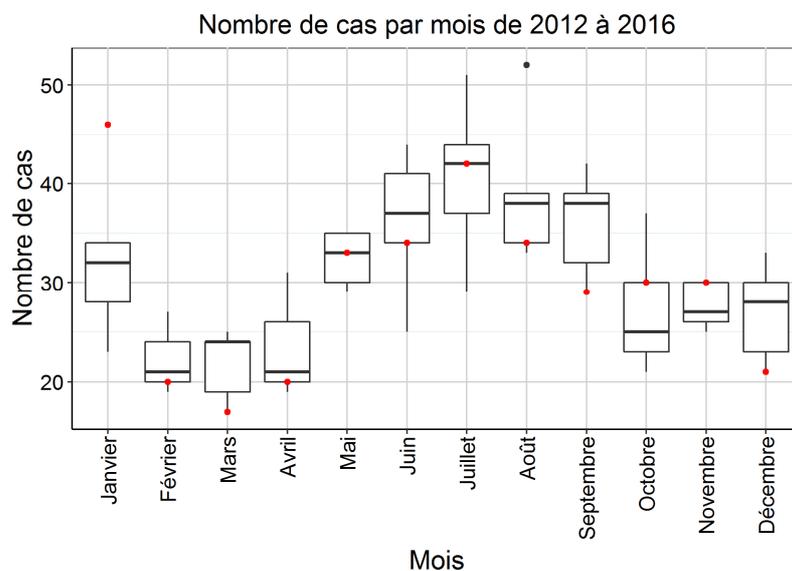
En 2016, 6 cas sporadiques de listériose ont été identifiés dans les DROM-TOM-DOM : 4 dans l'île de la Réunion, DROM-TOM-COM le plus peuplé (1 forme bactériémique et 3 formes materno-néonatales), 1 cas en Guyane française (forme materno-néonatale avec une *L. monocytogenes* du variant IVb-v1) et 1 cas en Guadeloupe (forme bactériémique).

Distribution temporelle des cas métropolitains

Le nombre mensuel de cas sporadiques observés de 2012 à 2016 est présenté dans la Figure 4.

En 2016, les mois où le plus grand nombre des cas ont été notifiés sont Janvier et Juillet (Figure 4), reflétant la saisonnalité habituelle des cas en France en Décembre-Janvier (période des fêtes de fin d'année) et en période estivale (de Juin à Aout). Les raisons de cette saisonnalité ne sont pas clairement identifiées (type d'aliments consommés ? Modalités de conservation des aliments ?).

Figure 4. Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine entre 2012 et 2016 (Le point rouge indique le nombre de cas pour 2016).



Distribution géographique

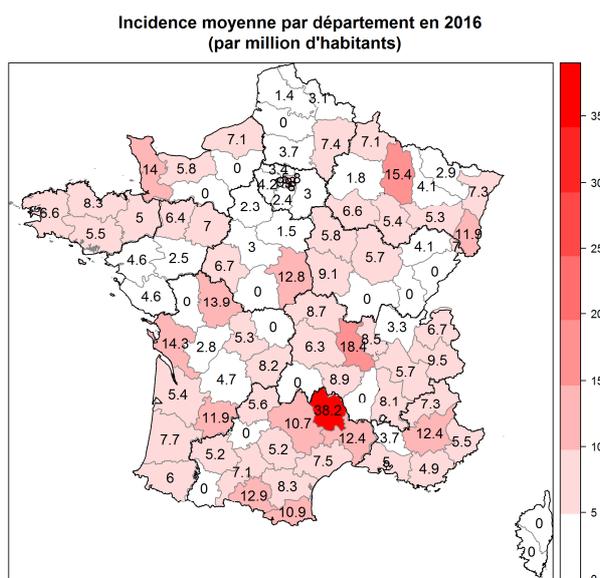
La distribution géographique des cas par département est présentée dans la Figure 5.

Les chiffres d'incidence sont exprimés en nombre de cas par 10^6 d'habitants par département et ont été calculés à partir des données démographiques établies par l'INSEE.

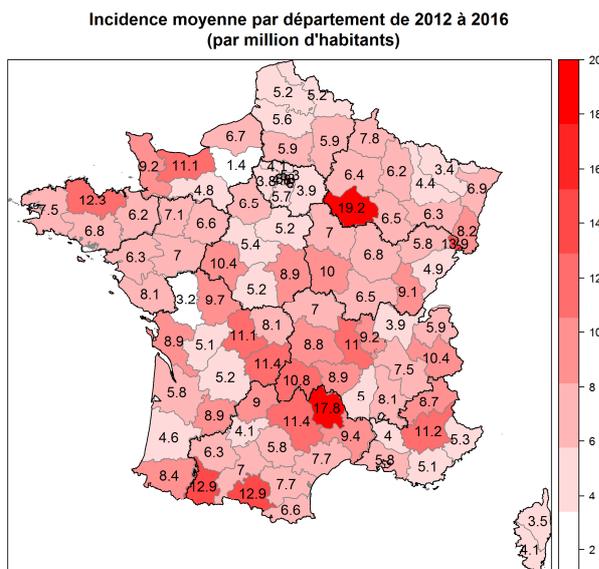
L'incidence régionale de la listériose est globalement plus élevée dans le sud de la France. En 2016, l'incidence de la listériose était la plus élevée dans les départements Lozère, Loire, Meuse, Charente-Maritime et Manche.

Figure 5. Incidences départementales des cas de listériose en 2016 (A) et de 2012 à 2016 (B) (Incidence par 10^6 d'habitants par département).

A



B

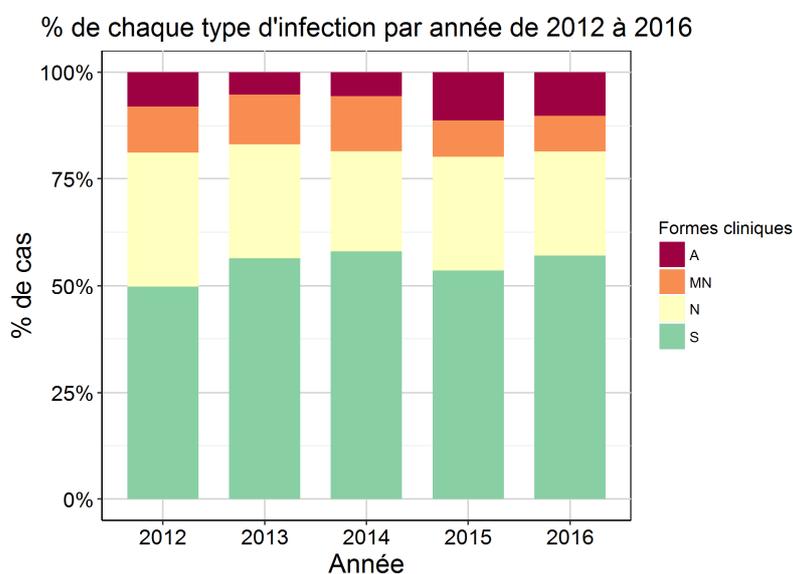


D - ANALYSE PAR FORME CLINIQUE

Les formes cliniques décrites dans ce chapitre et la Figure 6 sont celles retenues après échanges avec SPF.

La distribution des types d'infection reste stable d'année en année depuis 2012, avec une prédominance des cas septicémiques ($\geq 50\%$), puis viennent les formes neurologiques et les formes materno-néonatales (Figure 6).

Figure 6. Distribution des cas sporadiques de listériose survenus en France métropolitaine depuis 2012 par forme clinique et par année.



Formes materno-néonatales

En 2016, 30 formes MN ont été enregistrées (2015 : 34), représentant 8,4% du nombre total de cas sporadiques (2015 : 8%). En 2016, l'incidence des formes MN était de 4,9 pour 100.000 naissances vivantes (2015 : 4,5), l'une des plus faibles enregistrées depuis 2006. Le nombre de cas MN a diminué de 51% entre 1999 et 2008, puis s'est stabilisé depuis autour de 35 à 40 cas par an (représentant 8 à 15% du total des cas ; Figure 7). Cette diminution

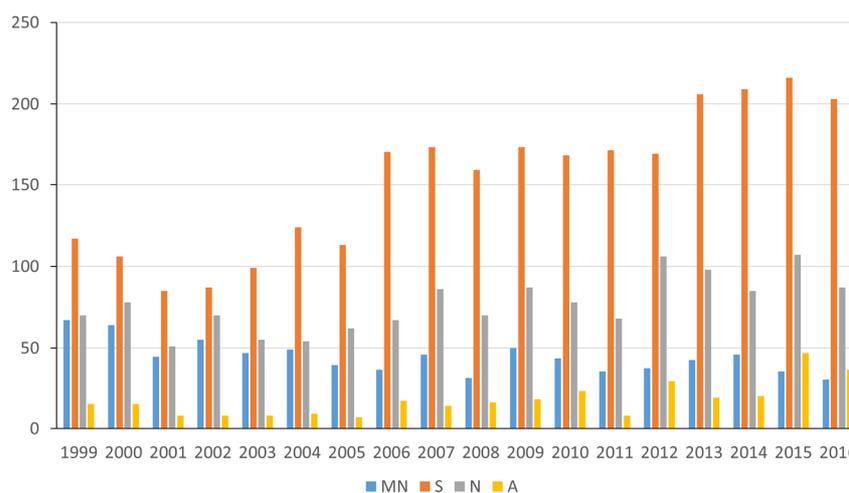
pourrait s'expliquer au moins en partie par les campagnes de recommandations alimentaires destinées aux femmes enceintes.

L'étude prospective MONALISA a mis en évidence une incidence plus élevée de listériose MN au sein des populations originaires d'Afrique sub-saharienne ou du Maghreb (origine Africaine ou Maghrébine rapportée par 33% des patientes versus 11% des femmes enceintes en France) (2). Les déterminants de ce déséquilibre ne sont pas élucidés (lien avec une situation socio-économique défavorisée (comme en Grande-Bretagne (6)) et/ou une consommation accrue d'aliments à risque (comme au sein des minorités d'origine Mexicaine aux USA (7))). **Ceci pourrait justifier des actions ciblées vers ces populations pour optimiser la prévention de la listériose.**

Formes non materno-néonatales

En 2016, 327 formes non materno-néonatales ont été enregistrées (368 en 2015), soit 92 % du total des cas sporadiques. Elles se répartissent en 204 formes S, 88 formes N et 35 autres formes. La Figure 7 indique la répartition de ces formes, stable par rapport à 2015.

Figure 7. Répartition des formes cliniques par année, depuis 1999.



Le Tableau 1 décrit la répartition des infections invasives classées comme « autres formes » de 2006 à 2016.

Les infections ostéoarticulaires (8), biliaires (9) et urinaires (10) ont fait l'objet d'analyses spécifiques dont les résultats ont été publiés. D'autres travaux sont en cours concernant les infections endovasculaires, pleuro-pulmonaires, ganglionnaires, cutanées et les infections de liquide d'ascite. Une revue sur les formes oculaires avec l'ECDC et intégrant les cas survenus en France depuis 1987 a été publiée en Janvier 2017 (11).

Terrain des formes non materno-néonatales. Des renseignements cliniques transmis par le biologiste accompagnent chaque souche à leur réception au CNRL. Ces données étaient renseignées dans 92% des cas en 2016 (2015 : 92%). Dans 56% des cas renseignés en 2016, une ou plusieurs pathologies sous-jacentes étaient rapportées : cancer, cirrhose, éthylisme, diabète, dialyse, infection par le VIH, transplantation d'organe ou traitement immunosuppresseur (12) (54% de 2011 à 2015). Les comorbidités des patients avec listériose ont été analysées en détail dans le cadre de l'étude MONALISA, récemment publiée (2).

Tableau 1. Répartition des autres formes de listériose de 2006 à 2016

Autres formes	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
Vasculaire	1	4	0	1	0	2	1	1	1	2	3	16
Adénopathie	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	5
Endocardite	2	0	0	1	0	0	0	1	2	2	3	11
Os/articulaire	4	3	8	7	4	2	5	6	8	18	12	77
Digestive	0	1	0	0	1	1	3	1	1	3	1	12
Foie	1	0	2	2	1	0	0	0	0	2	1	9
Œdème	1	1	2	2	6	0	0	0	0	0	0	12
Erysipèle	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Infection d'ascite	5	3	6	3	10	3	12	7	4	9	8	70
Infection urinaire	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	1	5
Pneumopathie	0	0	1	1	2	1	3	1	3	3	3	18
Prostatite	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Infection oculaire	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3
Infection cutanée	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	5
Abcès	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Fièvre/Céphalées	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	16	12	19	19	26	9	27	18	20	45	36	211

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

L'âge moyen des patients avec forme non-MN est de 76 ans en 2016, avec une médiane de 71 ans (0 à 107 ans). Ce chiffre est stable depuis 2006 (médiane mesurée entre 68 et 71 ans), alors qu'il n'était que de 62 ans en 1999 : ceci va dans le sens de l'allongement de la durée de vie observée dans la population française (<https://www.insee.fr/fr/statistiques/1906664?sommaire=1906743>) mais le dépasse : (+ 4.5 ans entre 1999 et 2012 en France, versus + 9 dans le cas des patients avec listériose déclarés au centre de référence) (Figure 8). La distribution par classe d'âge des cas non materno-néonataux montre la rareté des cas dans la classe d'âge 1-44 ans (Figure 9).

Parmi les sujets de plus de 60 ans, on note également une répartition bimodale des cas : patients âgés d'environ 65 ans et d'environ 75 ans. Les données de l'étude observationnelle MONALISA permettent de suggérer que ces patients présentent des caractéristiques différentes : patients âgés avec comorbidités liées à l'âge, et patients plus jeunes porteurs de comorbidités immunosuppressives (2).

Figure 8. Box plot des souches réceptionnées de 2012 à 2016 selon les formes cliniques et l'âge du patient. En rouge, les cas de 2016.

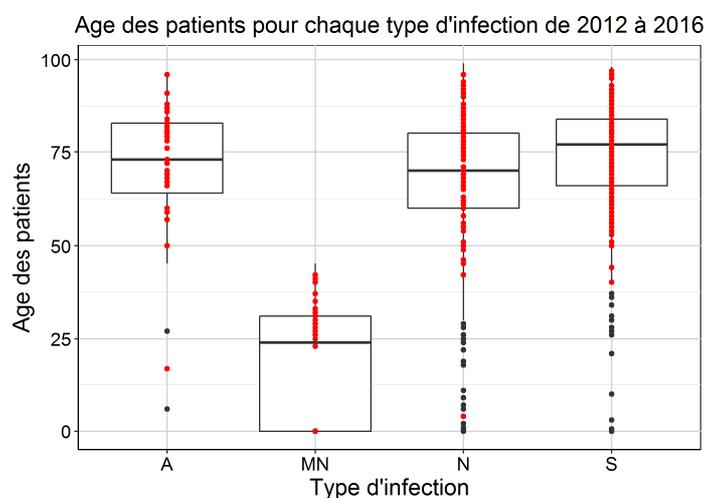
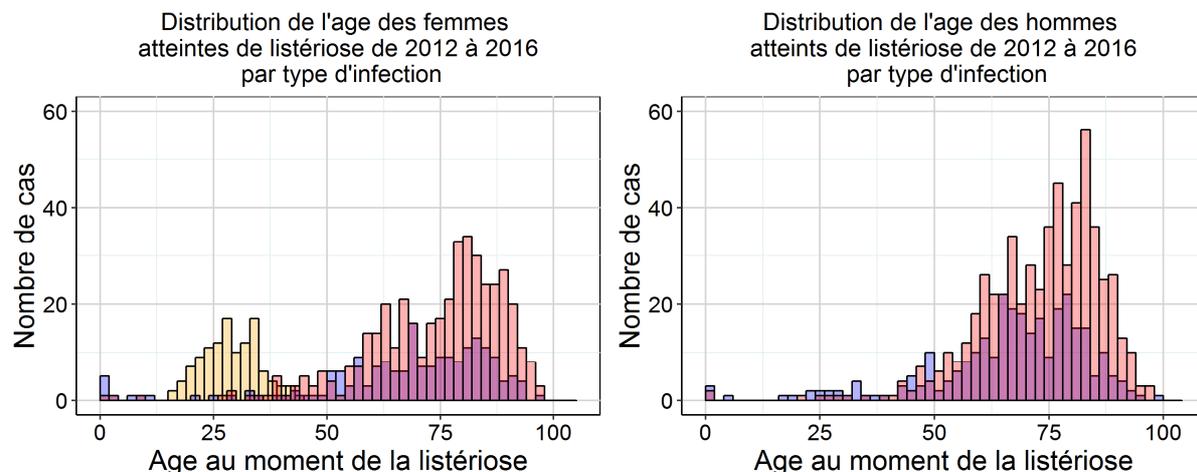
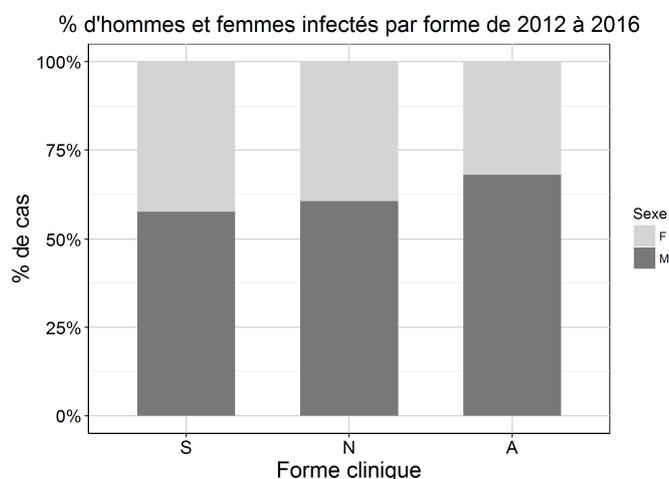


Figure 9. Distribution de l'âge des patients atteints de listériose entre 2012 et 2016 selon le sexe et le type d'infection. En jaune, les formes materno-néonatales. En rouge, les septicémies. En bleu, les formes neuroméningées. En violet, la superposition entre les formes septicémiques et des formes neuroméningées.



La distribution par sexe montre un excès significatif d'hommes par rapport au sexe ratio attendu dans cette classe d'âge (Figure 10). Le sexe ratio M/F était ainsi de 1,4 en 2016 (avec 63 % d'hommes (2011-2015 : 59%). Cette prédominance masculine des formes non-MN est constatée dans d'autres pays occidentaux (7, 13), et reste inexpliquée (différences d'exposition alimentaire ? prédisposition génétique liée au sexe ?).

Figure 10. Répartition du sexe selon les formes cliniques S, N et A de 2012 à 2016



D - Analyse microbiologique

Analyse par groupe PCR ou sérotype PCR

Analyse générale

Les distributions par groupe PCR et par année des souches d'origine humaine isolées de 2006 à 2016 en France métropolitaine sont présentées dans le Tableau 2 et Figure 11.

Le groupe PCR majoritaire des souches humaines isolées comme en 2015 était le groupe PCR IVb. Il représente plus de 49% des souches, suivi du groupe PCR IIa (35%), IIb (13%), puis IIc (3%). Depuis 2006, cette distribution

est stable, et diffère de celle observée pour les souches alimentaires, pour lesquelles le groupe PCR IIa est majoritaire (51%) (Figure 11).

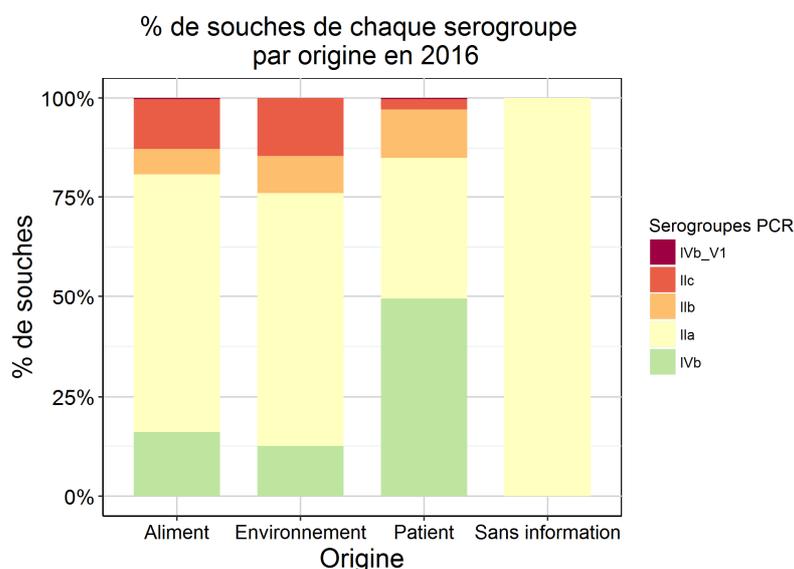
Un cas humain causé par une souche appartenant au variant v1 du Groupe PCR IVb (précédemment décrit par le CNRL) a été identifié ; il s'agit du cinquième identifié en France. Les souches de ce variant IVb-v1 sont de cgMLST différents et ne représentent pas l'émergence d'un nouveau clone d'un type cgMLST particulier. Ce variant a déjà été à l'origine de cas groupés en dehors de la France (14).

Tableau 2. Répartition des groupes PCR par année depuis 2006

Groupe PCR	Souches du sérovar	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
IIa	1/2a ou 3a	79 (29%)	90 (30%)	89 (33%)	88 (28%)	100 (34%)	85 (31%)	98 (29%)	135 (37%)	137 (38%)	129 (32%)	126 (35%)
IIb	1/2b, 3b ou 7	47 (17%)	45 (15%)	27 (10%)	47 (14%)	40 (13%)	40 (14%)	43 (13%)	32 (9%)	39 (11%)	65 (16%)	45 (13%)
IIc	1/2c ou 3c	11 (4%)	14 (5%)	11 (4%)	24 (8%)	5 (2%)	6 (2%)	12 (3%)	12 (3%)	9 (3%)	10 (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%)	198 (49%)	176+1 (49%)
L	4ab ou 4c ou 4a	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (<1%)
Total		271	303	268	319	298	277	338	363	359	402	357

* variant du Groupe PCR IVb

Figure 11. Répartition des sérogroupes PCR par origine



La distribution mensuelle des 5 principaux groupes PCR ne met pas en évidence de saisonnalité. La distribution régionale des souches par groupe PCR ne met pas en évidence de prédominance géographique d'un groupe PCR particulier.

Distribution des groupes PCR selon la forme clinique

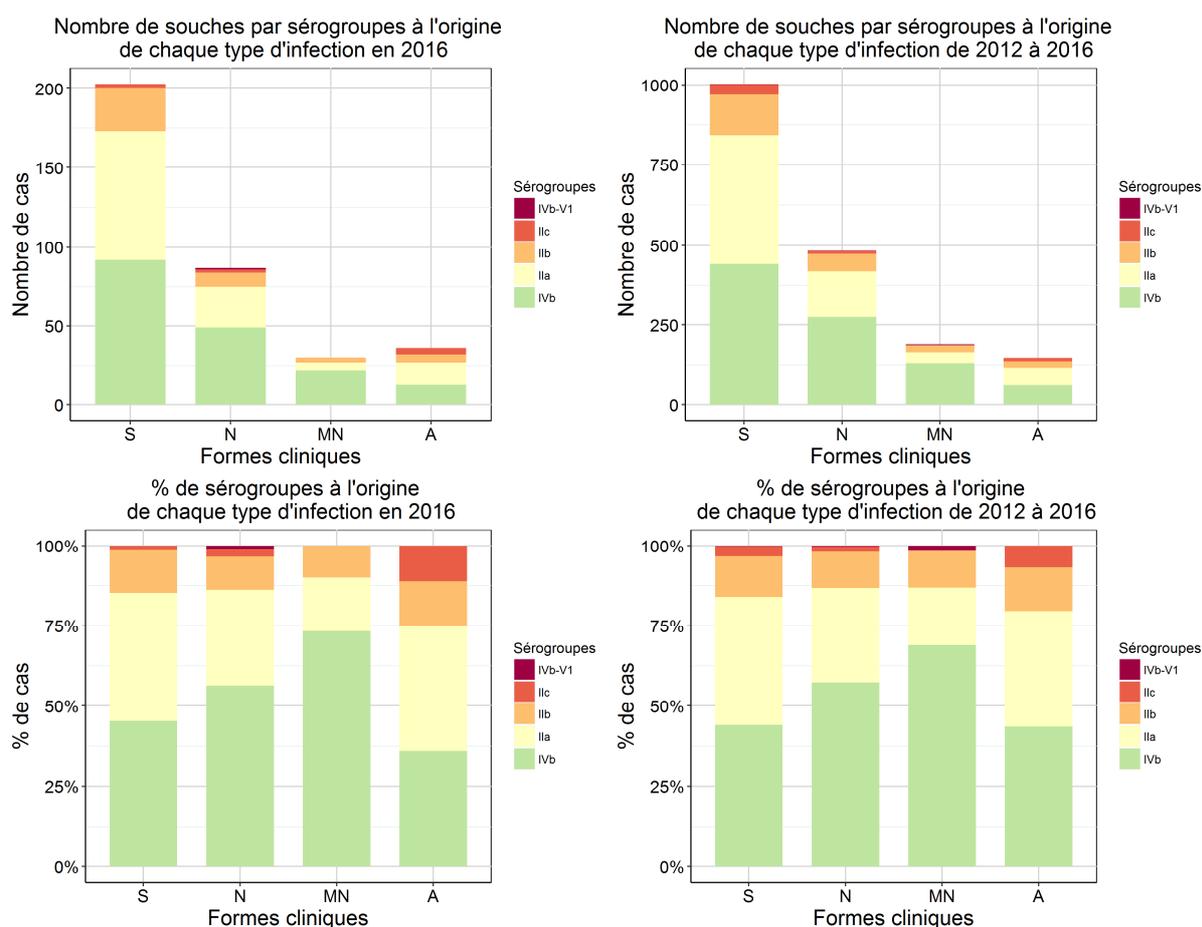
Depuis 2006, les souches des groupes PCR IVb et IIa sont les plus fréquemment impliquées, quel que soit le type d'infection (Tableau 3 et Figure 12). Le séro-groupe IVb est ainsi impliqué dans 49% des cas au total, et dans 73% des cas MN et 56% des cas N (Tableau 3). Le groupe PCR IIc est n'est en revanche que très rarement responsable de listérioses humaines, en particulier pour les formes MN et N. Aucune corrélation entre l'âge du patient et le groupe PCR n'a été identifiée.

Tableau 3. Répartition des groupes PCR des souches selon les formes cliniques en 2016

	Materno-néonatale	Septicémie	Infections du système nerveux central	Autres formes	Total
IIa	5	81	26	14	126 (35%)
IIb	3	27	10	5	45 (13%)
IIc	0	3	2	4	9 (3%)
IVb + IVb-v1*	22	93	49	12	176+1 (49%)
L	0	0	1	0	1 (<1%)
Total	30	204	88	35	357

* variant Groupe PCR IVb

Figure 12. Distribution par groupes PCR des formes cliniques majoritaires de listériose survenues en France métropolitaine en 2016



Analyse PFGE/MLST

Grâce à l'utilisation d'un dictionnaire PFGE/MLST établi par le CNR, le clone MLST de toutes les souches ayant été analysées par PFGE a pu être déterminé. Ceci nous a permis d'étudier la prévalence et la distribution des clones MLST dans les échantillons cliniques et alimentaires, en collaboration avec le groupe de S. Brisse (Institut Pasteur) (1).

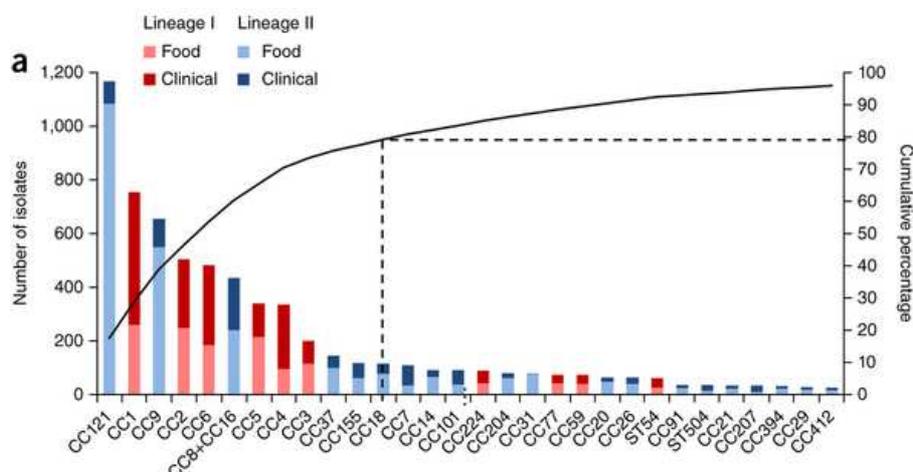
Aspect général

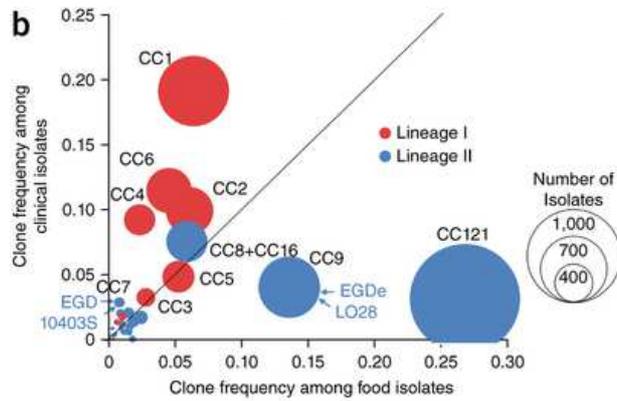
La prévalence et la distribution des clones MLST dans les échantillons cliniques et alimentaires ont été étudiées sur 6633 isolats collectés de manière exhaustive par le CNRL entre 2005 et 2013 (1).

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

Pour permettre une identification rapide des clones MLST majeurs, le CNRL, en collaboration avec le groupe de S. Brisse, a mis au point un ensemble de 3 PCR multiplexes permettant l'identification des 11 clones MLST les plus fréquents dans les échantillons cliniques et alimentaires, incluant les clones hyper- et hypo- virulents (15). **Cette méthode a l'avantage d'être plus rapide et moins coûteuse que la méthode MLST classique, ce qui la rend plus accessible par les laboratoires désireux d'identifier le clone MLST de leurs souches de *Lm* et d'en déduire une estimation de leur potentiel infectieux.**

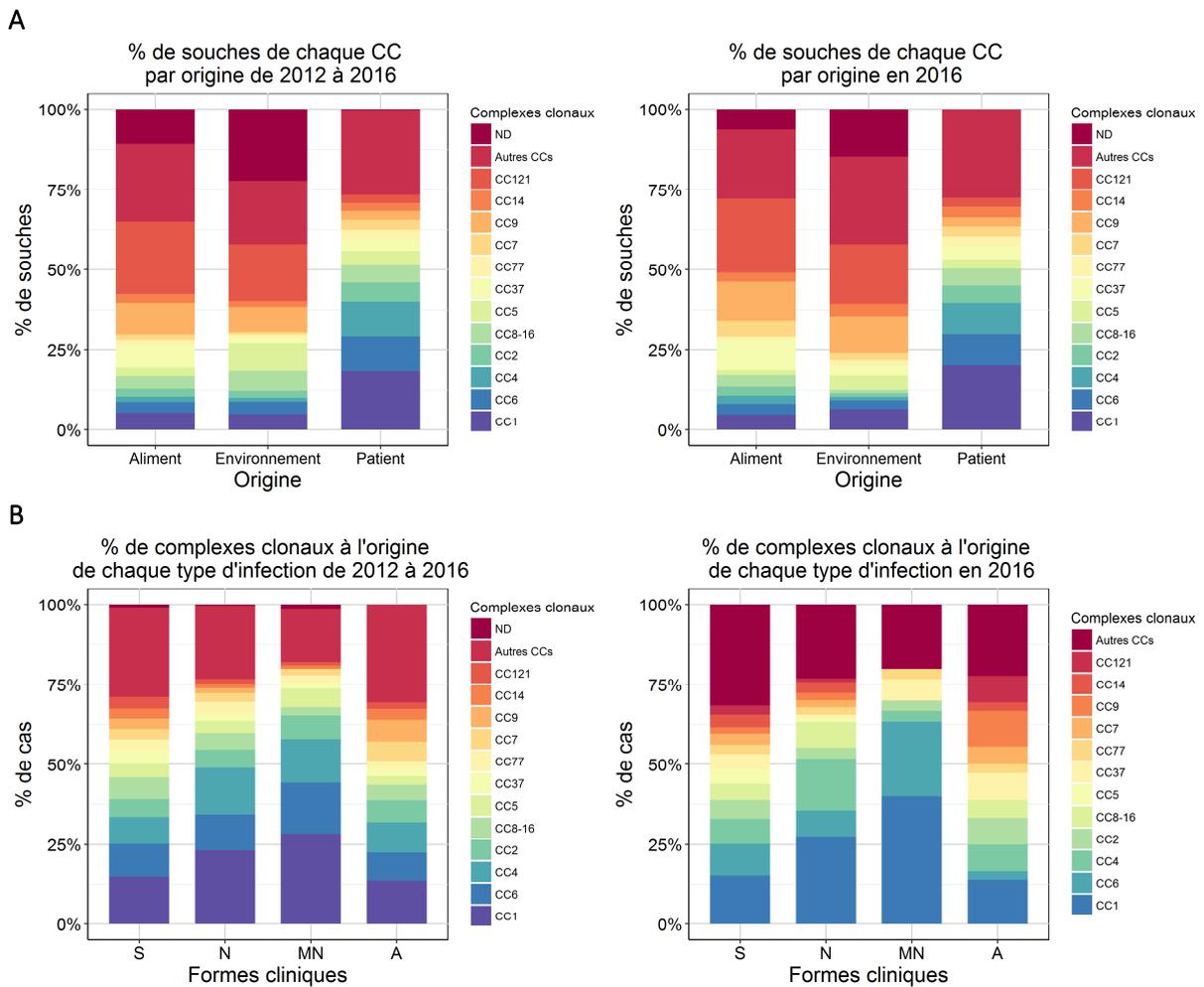
Figure 13. Prévalence et distribution des clones MLST de *Lm* dans les sources clinique et alimentaire d'isolement (Source : Maury, Tsai *et al.*, 2016). Seuls les clones avec plus de 10 isolats sont représentés. (a) Prévalence des clones MLST de *Lm*. La courbe représente le pourcentage cumulatif d'isolats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





La Figure 14 montre la distribution, par formes cliniques, des différents clones des isolats cliniques collectés de 2012 à 2016. Elle montre une grande diversité des clones impliqués dans les infections cliniques, avec la prédominance des clones hypervirulents (CC1, 2, 4 et 6) dans les infections neurologiques et materno-néonatales (1).

Figure 14. Distribution des clones MLST par origines et types d'infection pour les isolats collectés de 2012 à 2016. (A) Distribution par origines. (B) Distribution par types d'infection. Les clones les plus fréquents sont représentés.



Analyse génomique par cgMLST

Cette analyse réalisée par le CNRL et SPF est soumise pour publication et se trouve en annexe D de ce rapport.

E - Etude de la résistance aux antibiotiques

Toutes les souches d'origine clinique identifiées présentent une résistance naturelle *in vitro* à la céfotaxime, à la clindamycine, à la fosfomycine, aux sulfonamides et à l'acide nalidixique.

Depuis 2001, toutes les souches humaines identifiées sont sensibles à l'ampicilline, à l'amoxicilline, à la gentamicine (Figure 15), à l'imipénème, à l'acide fusidique, à la pénicilline et au chloramphénicol (16).

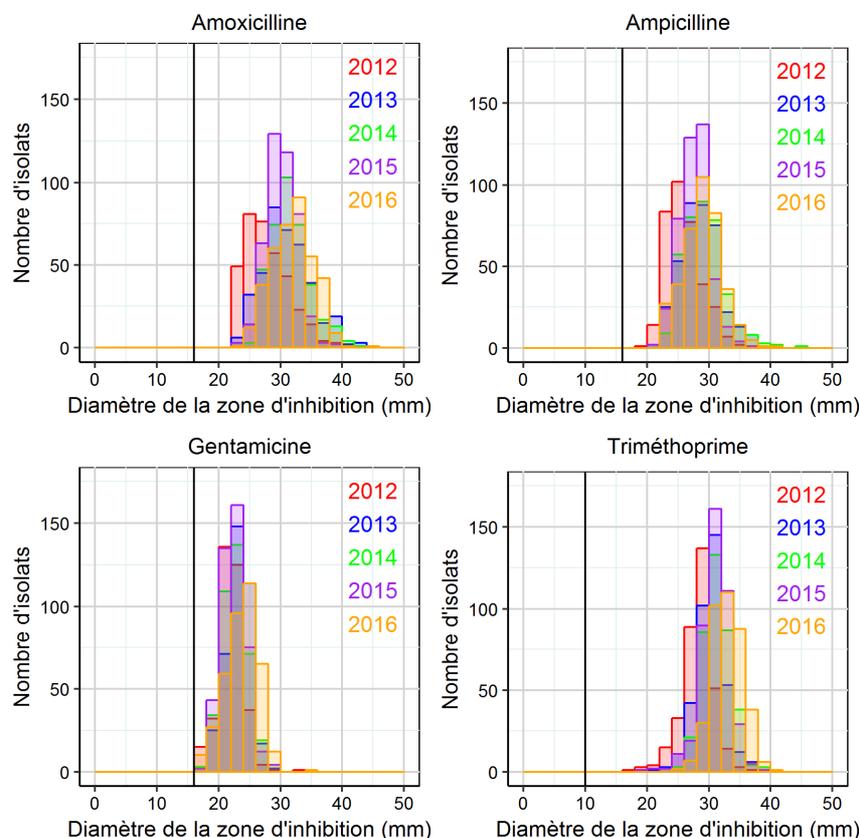
Les souches étaient très majoritairement sensibles à l'érythromycine, à la tétracycline, à la moxifloxacine, à la lévofloxacine, à la vancomycine, à la kanamycine et la streptomycine. Cependant, 2 souches résistantes à la tétracycline ont été identifiées en 2016 (résistance contact), avec détection moléculaire du gène *tetM*.

Les souches avec des résistances atypiques non encore décrites sont étudiées en collaboration avec le CNR de la résistance aux antibiotiques. Deux observations d'infections impliquant des souches résistantes à la rifampicine ont été rapportées en France en 2015 et 2016 (17) (18).

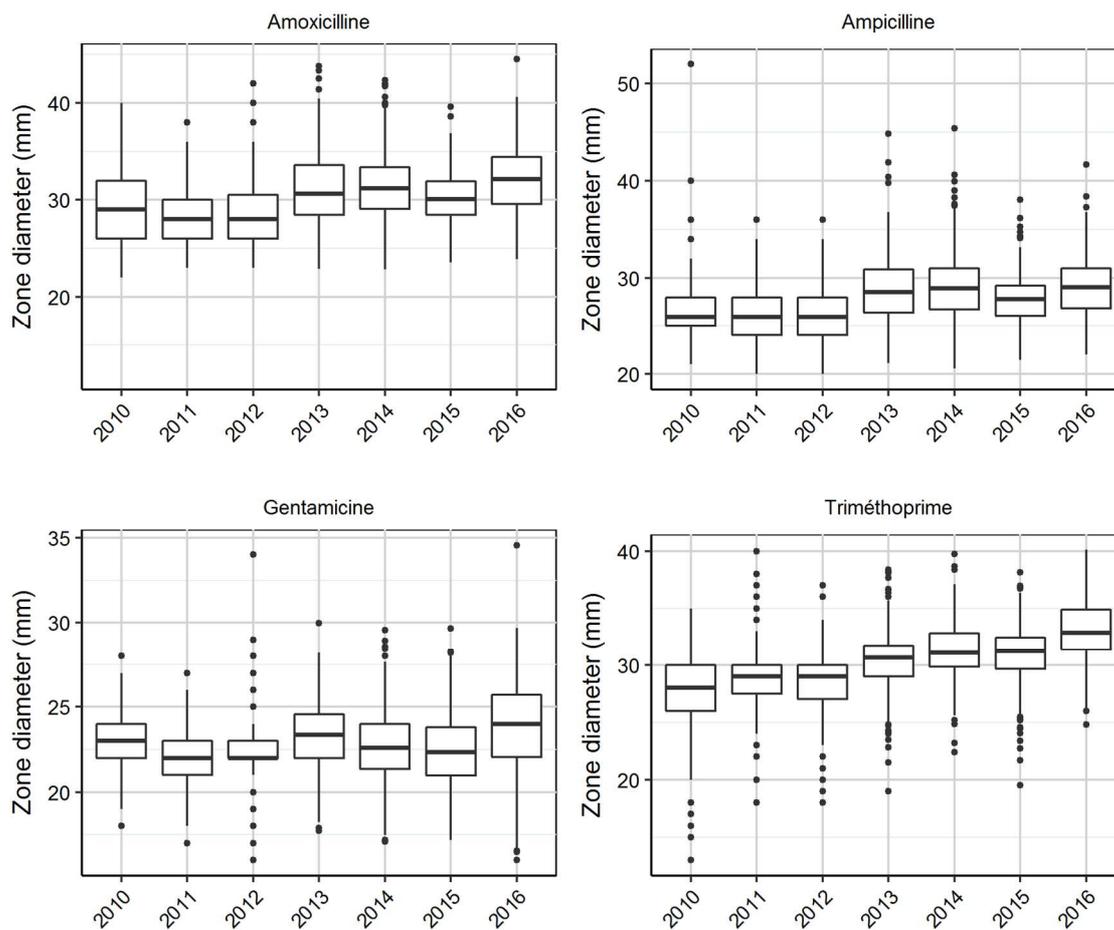
Bien que des souches d'origine non humaine résistantes à l'ampicilline ou à la gentamicine aient déjà été décrites dans d'autres régions du monde (19) aucune observation similaire n'a été faite en France pour des souches cliniques. Le suivi des tendances de la sensibilité de *Lm* aux antibiotiques de référence (Amoxicilline, Ampicilline, Gentamicine, Triméthoprime-Sulfaméthoxazole) montre la persistance d'une excellente sensibilité des souches à ces antibiotiques. Les conséquences de l'émergence d'une telle résistance seraient majeures, dans la mesure où l'amoxicilline est l'antibiotique utilisé en première intention pour le traitement de la listériose (20, 21).

Figure 15. Distribution des diamètres des zones d'inhibition pour l'ampicilline, l'amoxicilline, la gentamicine et le triméthoprime des souches reçues entre 2012 et 2016 (Légende : le trait noir indique la valeur de référence EUCAST définissant la résistance). A : Histogrammes ; B : Boîtes à moustaches.

A



B



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

Les souches isolées lors de contrôles sanitaires (Alertes de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), et d'investigations autour de cas humain) sont systématiquement adressées au CNRL. Chaque professionnel de l'industrie agroalimentaire (laboratoires privés ou publics) peut également, dans le cadre d'autocontrôles, envoyer ses souches pour caractérisation au CNRL ou au Laboratoire National de Référence de *Lm* (LNRI) de l'ANSES à Maisons-Alfort. Le LNRI reçoit également les souches des plans annuels de surveillance et de contrôle de *Lm* conduits par la DGAI, afin d'estimer le niveau de contamination d'aliments de différentes filières. Le CNRL reçoit enfin des souches alimentaires dans le cadre de contre-expertises diligentées par les assureurs pour confirmation de résultats de caractérisation.

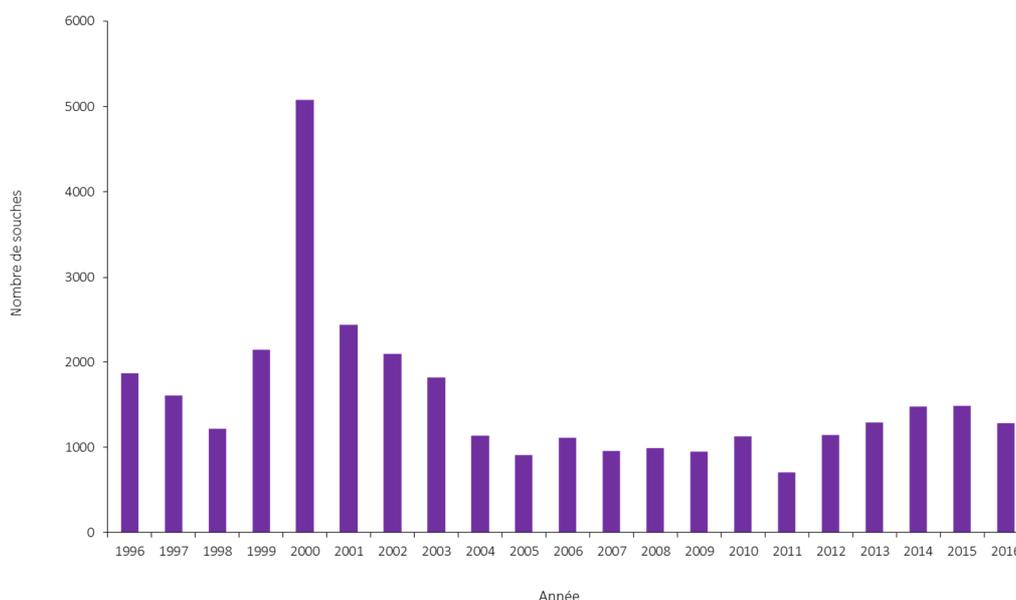
Analyse générale

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

En 2016, 1278 souches de cette catégorie ont été reçues, ce qui représente une baisse de 15% par rapport à 2015 (n = 1488) (Figure 16).

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



- Les laboratoires expéditeurs

La répartition des 1278 souches non humaines reçues au CNRL en 2016, par catégories de laboratoires expéditeurs, est stable depuis 2011, et est la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 392 souches (31%) [2015 : 422]
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 817 souches (64%) [2015 : 984]
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 16 souches (1%) [2015 : 9]
- Laboratoires ANSES – LNRI : 51 souches (4%) [2015 : 62]
- Laboratoires d'Hygiène de Centres Hospitaliers : 2 souches (<1%) [2015 : 11]
- Laboratoires de recherche : 0 souche (0%) [2015 : 0]

En 2016, 1277 des souches non humaines provenaient de France métropolitaine et 1 des DROM (Guyane).

- L'origine des souches

La répartition par origine des souches non humaines reçues en 2016 était la suivante :

- Souches isolées d'aliments : 1028 souches (80%) [2015 : 1177]
- Souches isolées de l'environnement : 213 souches (17%) [2015 : 274]
- Souches de recherche/sans information : 37 souches (3%) [2015 : 37]
- Souches isolées chez l'animal : 0 souche (<0%) [2015 : 0]

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

- Remarques globales de fonctionnement

Seuls 84% des souches reçues en 2016 appartenaient à l'espèce *Lm* (95% en 2015), qui est la seule espèce mentionnée dans les réglementations de sécurité sanitaire des aliments et de l'environnement. En effet, certains laboratoires, à la demande de leurs clients, envoient pour confirmation des souches assignées à d'autres espèces de *Listeria* (22).

Le taux de réception de cultures non pures, contaminées par d'autres espèces bactériennes, est élevé, autour de 28%, ce qui allonge le délai d'analyse et peut entraîner un retard dans les investigations épidémiologiques.

Souches isolées d'aliments

- Catégories de laboratoires ayant adressé les souches

La répartition des 1028 souches isolées d'aliments reçues au CNRL de 2016 pour les différentes catégories de laboratoires expéditeurs était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 303 (29%) [2015 : 361]
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 662 (64%) [2015 : 766]
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 16 (2%) [2015 : 9]
- Laboratoires ANSES-LNRI : 46 (5%) [2015 : 33]
- Laboratoires d'hygiène de Centres Hospitaliers : 1 (<1%) [2015 : 8]

En 2016, le nombre de souches isolées d'aliments reçues au CNRL a diminué de 5% par rapport à 2015. Parmi elles, 1 souche provenait d'un échantillon prélevé dans le cadre d'un plan de surveillance ou de contrôle lors d'un dépassement de seuil réglementaire et 7 d'une investigation de dépassements de seuils (toutes envoyées au CNRL par le LNRI).

- Nombre de souches et distribution par espèce

Sur un total de 1028 souches d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2016, 1007 (98%) ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Lm* (92% en 2015). Toutes les souches reçues ont été analysées.

En 2016, 5 souches n'appartenaient pas au genre *Lm*; il s'agissait de *Bacillus circulans*, dont les colonies présentent des colonies d'aspects évocateurs de *Listeria* spp. sur milieu Agar selon Ottaviani et Agosti (23). Ces souches d'espèces non *Listeria* sont réassignées par MALDI-TOF (Bruker). A réception, 1 souche n'était pas viable et 2 tubes cassés n'ont pas été analysés.

La répartition par espèce des 1028 souches de *Listeria* d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2016 était la suivante :

- *L. monocytogenes* : 1007 souches (97%) [2015 : 990]
- *L. innocua* : 8 souches (2%) [2015 : 36]
- *L. welshimeri* : 5 souches (<1%) ([2015 : 21]
- *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* : 0 souches (<1%) [2015 : 26]

L'identification des espèces est confirmée par l'analyse ANIb (Average Nucleotide Identification) des souches à partir des séquences génomiques. Les souches *Listeria* spp. autres que l'espèce *monocytogenes* sont considérées comme bio-indicateurs de la présence éventuelle de *Lm* dans les aliments et/ou son environnement par les États-Unis et les industriels français de l'agro-alimentaire, principalement de l'industrie laitière.

↳ En 2017, la publication des deux normes analytiques NF EN ISO 11290 pour la recherche et le dénombrement des *Lm* et *Listeria* spp. devrait aboutir à l'augmentation du nombre d'identifications de souches non *Lm*.

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

La répartition par catégories d'aliments des 1007 souches de *Lm* d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2016 était la suivante :

- Viande et produits carnés : 507 souches (51%) [2015 : 443]
- Lait et produits laitiers : 257 souches (26%) [2015 : 308]
- Produits de la pêche : 151 souches (15%) [2015 : 89]
- Végétaux : 30 souches (3%) [2015 : 20]
- Autres aliments : 36 souches (4%) [2015 : 115]
- Sans information (confidentiel) : 7 souches (<1%) [2015 : 15]

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

En 2013, une tolérance aux ammoniums quaternaires, comme le chlorure de benzalkonium, de souches alimentaires et environnementales (Complexes clonaux CC121, CC5 (et quelques souches du CC9)) a été décrite. Ce composé est très utilisé par les industries agro-alimentaires pour le nettoyage des ateliers et équipements, ainsi que comme désinfectant en médecine et en cosmétologie. Une PCR ciblant un gène responsable de cette résistance a été mise au point (24). **Le CNRL identifie, par le biais du séquençage génomique, la présence des gènes connus pour être associés à la tolérance ou résistance aux antiseptiques.**

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

La répartition des souches par groupes PCR et par catégories d'aliments est présentée dans le Tableau 4. Le groupe majoritaire est le groupe PCR IIa (sérovars 1/2a, 3a), quelle que soit la catégorie d'aliment, comme depuis 2006. Il est suivi par les groupes PCR IIc et IVb.

Comme l'illustrent la Figure 17 et le Tableau 4, le groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) ne représente que 16% des souches alimentaires analysées en 2016 (18% des souches isolées d'aliments de 2011 à 2015), alors qu'il est le groupe le plus fréquemment impliqué en pathologie humaine. À l'inverse, le groupe IIc, très présent dans les aliments, est très rare en clinique. Ceci suggère une virulence accrue des souches du groupe IVb par rapport aux autres (25-29), ce que nous avons démontré expérimentalement (25-29). Les souches de ce groupe expriment une InIA fonctionnelle (facteur de virulence permettant la traversée des barrières intestinale et placentaire de l'hôte), tandis que celles du groupe IIc expriment en majorité une InIA tronquée et non fonctionnelle (26, 27, 29). Dans un modèle murin humanisé d'infection, les souches du groupe IVb apparaissent également plus virulentes (1).

Figure 17. Distribution par groupes PCR des souches de *Lm* cliniques et alimentaires en 2016 et entre 2006 et 2016

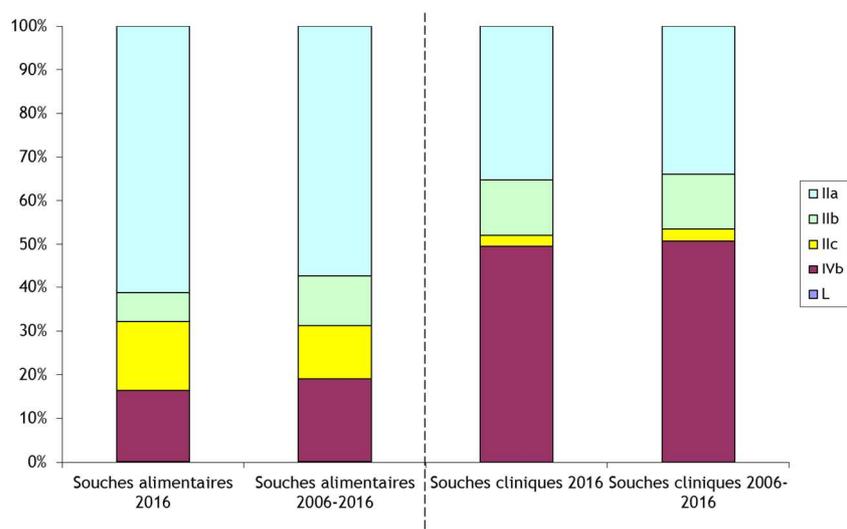


Tableau 4. Distribution par groupes PCR et par catégories d'aliments des souches alimentaires de *Lm* reçues au CNRL en 2016

Groupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total	Souches humaines
Ila	300	169	86	15	23	21	614 (61%)	126 (35%)
IIb	20	25	14	6	0	0	65 (7%)	45 (13%)
IIc	116	3	35	3	0	1	158 (16%)	9 (3%)
IVb	70	55	14	6	13	3	161 (16%)	176 (49%)
IVb-V1	0	1	1	0	0	0	2 (<1%)	1 (<1%)
L	0	1	0	0	0	0	1 (<1%)	0 (0%)
Total	506	254	150	30	36	25	1001	357

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

Une analyse similaire peut être pratiquée sur la base du typage MLST (Figure 14). Certains complexes clonaux, comme les CC121 et CC9, sont ainsi beaucoup plus souvent reliés aux souches alimentaires qu'aux souches cliniques ; ils ont été démontrés comme hypovirulents (1). A l'inverse, les clones CC1, 2, 4 et 6 sont beaucoup plus fréquemment identifiés en pathologie humaine que dans l'alimentation, et ont été identifiés comme hypervirulents (1).

Souches isolées de l'environnement de production alimentaire industrielle

En 2016, 213 souches (2015 : 274 souches, soit -22%) provenant de l'environnement ont été reçues au CNRL, adressées par des laboratoires vétérinaires départementaux (n=89, 2015 : 82), des laboratoires privés (n=119, 2015 : 192) ou l'ANSES (LNR, LCSSV) (n=5, 2015 : 0). **Il s'agit principalement d'échantillons prélevés sur des surfaces dans des industries agro-alimentaires ou isolées de réfrigérateurs dans le cadre d'enquêtes alimentaires** (article 5 du règlement européen EC 2073/2005 modifié sur les prélèvements de surface en agro-alimentaire et avec le guide complémentaire à la norme EN ISO 18593 sur les prélèvements de surface pour *Lm* : Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Lm*: https://sites.anses.fr/en/system/files/LRUE%20Lm-Lignes%20directrices%20pr%C3%A9%20l%C3%A8vement_V3_20-08-2012.pdf).

Ces souches étaient assignées à l'espèce *L. monocytogenes* (n = 203), *L. innocua* (n = 4), *L. welshimeri* (n = 5), *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* (n = 1).

La répartition par groupe PCR des 198 souches (dont 5 non caractérisées) de *Lm* environnementales isolées en 2016 est la suivante :

- groupe PCR Ila (sérovarys 1/2a et 3a): 125 souches (63%) (2015 : 135)
- groupe PCR IIb (sérovarys 1/2b, 3b et 7): 20 souches (10%) (2015 : 60)
- groupe PCR IIc (sérovarys 1/2c et 3c): 28 souches (14%) (2015 : 26)
- groupe PCR IVb (sérovarys 4b, 4d et 4e): 25 souches (13%) (2015 : 31)
- groupe PCR L (autres sérovarys): 0 souche sérotype 1/2a (<1%) (2015 : 0)

Les souches des groupes PCR Ila, IIc, et IVb sont majoritaires et représentent 90 % des souches.

En 2016, les CCs les plus fréquents dans l'environnement de production alimentaire étaient, par ordre décroissant, CC121, CC101-90, CC9, CC1 et CC31. De 2012 à 2016, CC121, CC5, CC9, CC8-16 et CC1 étaient les plus représentés. Les CCs hypovirulents et de virulence intermédiaire (1) sont donc prédominants dans cet environnement.

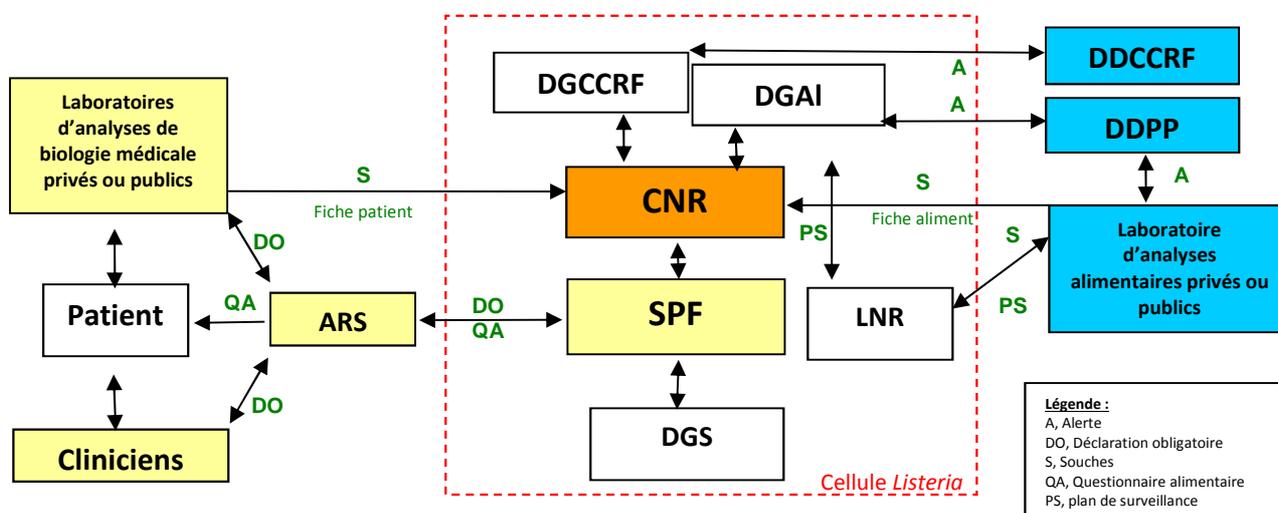
Ces données restent peu représentatives des souches qui circulent dans l'environnement à cause du faible échantillonnage de ces souches, et de leur origine particulière. L'isolement de souches à partir d'environnements naturels (tels que le sol, l'eau, la boue) serait important pour comprendre la circulation des souches entre cet environnement naturel, les aliments et l'hôte humain, et pour déterminer la nature du réservoir de *Listeria*.

2.4. PARTICIPATION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE

2.4.1. Contribution à la surveillance nationale

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 18) (30). Cette surveillance s'effectue en lien avec SPF, la Direction Générale de la Santé (DGS), la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) et la Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), qui composent depuis 1992 la **cellule *Listeria***, rejoints depuis 2007 par le Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* (LNR) du 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 18. Schéma de fonctionnement de la cellule *Listeria*



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

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 présentée à la Figure 19.

SURVEILLANCE ET CLUSTERS

Plusieurs étapes successives d'alerte étaient définies jusqu'à décembre 2016. Ce schéma d'alerte a évolué en Janvier 2017 sur la base de l'analyse génomique cgMLST qui remplace la macrorestriction d'ADN (PFGE):

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

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

2. Définitions dans le cadre de l'analyse par profil de macrorestriction d'ADN

- 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.

- Un **dépassement de seuil (« cas groupés »)** est défini dans cette approche 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 similaire. Deux pulsotypes sont dits similaires s'ils diffèrent d'une bande en position ou en présence pour les enzymes de restriction *Ascl* et/ou *ApaI*. 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).

3. Surveillance microbiologique hebdomadaire

Le CNRL effectue chaque semaine un rapport sur chaque dépassement de seuil et un bilan des clusters génomiques 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. En 2017, un seul tableau de suivi des clusters rassemblant souches humaines et souches alimentaires/environnementales a été institué.

4. 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 SPF conduit les questionnaires alimentaires et les enquêtes épidémiologiques appropriées. La Cellule *Listeria* décide au vu des résultats de ces investigations des actions à mettre en œuvre : analyse des informations disponibles (résultats des contrôles, retraits de produits), demande de transmission au CNRL de souches isolées à la production ou à la distribution, identification des marques commercialisant les produits contaminés, prélèvements dans les magasins où s'approvisionnent les patients, enquêtes dans des établissements de production, etc. La phase de surveillance renforcée est close 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.

5. 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.

6. 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. Afin d'harmoniser avec la définition anglosaxonne « Outbreak », il a été convenu qu'une **épidémie nécessite l'identification de la source alimentaire**. Un cas isolé, survenant en dehors de cas groupés ou d'épidémie, est qualifié de sporadique. Cette notion se précise avec la génomique et sa grande discrimination entre les souches. La très grande majorité des cas de listériose identifiés par la déclaration obligatoire en France sont sporadiques.

7. 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.

2.4.2. Contribution à la 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) (22, 34), 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) (22, 34). 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. Ce rapport est doublé en 2016 par le tableau de suivi des clusters de cgMLST des souches humaines/alimentaires. SPF investiguait 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. En 2016, SPF investiguait uniquement les clusters cgMLST où une souche d'alerte produit était reliée. Les clusters 1 souche humaine/1 souche alimentaire ou environnementale étant très présents, de nombreuses investigations ont été demandées aux DDPP ce qui a changé les demandes habituelles sur des larges cas groupés.

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 et le Type cgMLST des souches isolées des aliments à celle(s) isolée(s) chez le patient afin de tenter d'identifier l'aliment à l'origine du cas.

2.4.3. Alerte sur les résistances atypiques aux traitements de référence

La surveillance de la résistance de *Lm* aux antibiotiques est effectuée pour 23 antibiotiques (céfotaxime, sulfonamides, kanamycine, clindamycine, rifampicine, tétracycline, erythromycine, chloramphénicol, ciprofloxacine, moxifloxacine, levofloxacine, 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. Les résultats de la surveillance des souches d'origine humaine isolées de 2016 sont présentés dans le chapitre 2.2.

2.4.4. Alerte Infections nosocomiales

Le caractère nosocomial des infections à *Lm* est difficile à établir, car l'incubation de la listériose peut être longue (35) 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 SPF et la comparaison des caractéristiques microbiologiques des souches concernées. Si les caractéristiques microbiologiques des souches (PFGE et cgMLST en 2016) sont identiques ou similaires, une enquête impliquant SPF, 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 bactériémies ou infections neuroméningées contractées chez des patients hospitalisés depuis plus de 15 jours et sans apport de nourriture extérieur entraînent une inspection de la cuisine hospitalière, et la réalisation de prélèvements alimentaires et de surface.

2.4.5. Interface avec les acteurs nationaux

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

En 2016, LE CNRL a mis en place en lien avec SPF la première année de surveillance génomique (en effectuant en temps réel la surveillance classique selon l'analyse PFGE et la surveillance par cgMLST).

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

ANSES et LNRI: Cette interaction est décrite dans le chapitre 7 de ce rapport.

Le CNRL participe à l'examen de saisines DGS/DGCCRF/DGAL en tant qu'expert pour le CES « BioRisk » de l'ANSES.

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 4.3.).

2.5. CONTRIBUTION AUX RESEAUX EUROPEENS ET INTERNATIONAUX DE SURVEILLANCE

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN EUROPE

ECDC

L'ECDC a mis en place un système volontaire d'investigations de cas groupés ou d'épidémies européens au moyen de la plateforme d'échanges EPIS (Epidemic Intelligence Information System), ouverte aux 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 CNRL participe activement au groupe de travail *Listeria* du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire (FWD) (M. Lecuit & A. Leclercq) et au « Workshop on whole-genome sequencing for food and waterborne pathogens » de l'ECDC du 21-22 Juin 2016 à Stockholm (M. Lecuit & S. Brisse).

Il contribue, par le biais de SPF, à la notification de données françaises dans la base ECDC TESSY (European Surveillance System), et participe ainsi à la surveillance des maladies infectieuses au niveau européen. Il participe également, en relation avec SPF, aux investigations de cas groupés ou épidémies européennes, nommées « Urgent Inquiries », et signalées via la base ECDC EPIS (Epidemic Intelligence Information System). Il assure la compatibilité de la base du CNRL avec la base Européenne TESSY Mol, qui est connectée à la base du CNRL depuis décembre 2012.

Il participe activement à l'exercice européen EFSA-ECDC, au projet ELITE (European *Listeria* Typing Exercise) et à la Base Line Study EFSA (étude sur la contamination des aliments prêts-à-consommer et les cas humains survenus sur la période 2010-début 2011).

Le CNRL participe également au programme EUPHEM (European Programme for Public Health Microbiology Training) de l'ECDC.

Le CNRL a participé en 2016 à la révision de l'Atlas de surveillance Food and Waterborne diseases, des rapports conjoints annuels EFSA-ECDC sur les zoonoses (EU Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Annual epidemiological report- Food and waterborne diseases and zoonoses). Il a également contribué à une revue sur les endophtalmies à *L. monocytogenes* initiée par l'ECDC : Chersich M, Takkinen J, [Charlier C](#), [Leclercq A](#), Adams P, Godbole G, Altmeyer U, Friesema I, Labbé Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter F, Luchters S, [Lecuit M](#), Cimino L. Diagnosis and treatment of *Listeria monocytogenes* endophthalmitis: a systematic review. Ocular Immunology and Inflammation 2017. Sous presse. doi: 10.1080/09273948.2016.1276788

EFSA

Le CNRL participe, en lien avec le Statens Serum Institute de Copenhague, au projet EFSA WGS intitulé « Closing gaps for performing a risk assessment on *L. monocytogenes* in ready-to-eat. Activity 3 – Comparison food and human isolates ».

DG SANTE (RASFF)

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

Ce système est complété au niveau mondial par le réseau INFOSAN de l'OMS. Le CNR/CCOMS est contacté pour expertiser certaines alertes avant leur envoi sur le réseau international.

CEN (Comité Européen de Normalisation)

En 2016, le CNRL a participé,

- 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 : il a actualisé le schéma d'identification des souches de *Listeria* spp.
- aux réunions du groupe de travail *Listeria* du mandat M381 de la Commission Européenne pour la validation des méthodes EN ISO 11290.
- au développement de la norme NF EN ISO 16140-6 sur la validation des méthodes microbiologiques de confirmation (identification, sérotypage, typage moléculaire).

EURL Lm

Créé en 2006 par la Commission Européenne, le laboratoire communautaire de référence des *Listeria* (EURL) est situé au laboratoire ANSES-LSA de Maisons-Alfort, également LNRL. Ses missions consistent à l'analyse de l'antibio-résistance 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'EURL ont finalisé un projet de recherche communs, dont un projet réalisé à la demande de la DG SANTE sur la caractérisation de souches ayant contaminé un produit à risque : le beurre (36).

Enfin, la DG SANTE a sollicité le CNRL/CCOMS afin d'évaluer la fréquence d'isolement, en Europe et en France, de souches de *Lm* non hémolytiques dans des échantillons alimentaires et vétérinaires. L'EU-RL/LNRL a ensuite envoyé une demande officielle aux CCOMS/CNRL des *Listeria* pour définir l'impact de ces souches atypiques sur la santé publique. Le CNRL finalise actuellement son étude sur (i) la prévalence de ces souches dans les échantillons cliniques, alimentaires et environnementaux, (ii) les origines moléculaires de ce caractère non hémolytique, et (iii) l'impact sur la virulence des souches.

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE INTERNATIONALE DE LA LISTERIOSE

OMS

L'Unité de Biologie des Infections héberge le Centre Collaborateur de l'OMS des *Listeria* (Site web : <http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-collaborateurs-l-oms-ccoms/listeriose-d-origine-alimentaire>).

Dans ce cadre, l'équipe du CNRL participe également à la surveillance internationale de la listériose, à la collecte de données pour l'analyse des risques réalisée par l'OMS, à la surveillance de la résistance aux agents antimicrobiens des *Listeria*, et à la formation des personnels qui le contactent (37, 38). Le CCOMS a ainsi formé des stagiaires désireux de s'initier aux techniques de surveillance et de typage de *Lm*. Il répond aux sollicitations de l'OMS et apporte s'il le peut une assistance technique en cas de crise sanitaire. Le large panel de souches qui lui sont envoyées par ses différents correspondants internationaux lui permet de conduire des études sur la biodiversité de *Listeria* à large échelle.

Office International des Epizooties (OIE)

Le CNRL à travers le CCOMS répond aux sollicitations de l'OIE sur des questions sur les *Listeria*.

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

Le détail des dépassements de seuils et les investigations qui en découlent sont des informations confidentielles de la Cellule Listeria et ne peuvent faire l'objet d'une analyse détaillée dans ce rapport d'activité. Ces données ne peuvent pas être divulguées à des tiers sans autorisation. Elles sont à la disposition de SPF au CNRL.

3.1. SUSPICIONS D'INFECTIONS NOSOCOMIALES

À 16 reprises en 2016 (29 en 2015), le diagnostic de plusieurs cas de listériose groupés temporellement et géographiquement (même hôpital, voire même service) a fait suspecter une source d'infection nosocomiale (39, 40). En 2016, 3 bactériémies contractées chez des patients hospitalisés depuis plus de 15 jours ont été investiguées (3 en 2015). Aucune infection nosocomiale n'a été identifiée dans ces cas.

Le CNRL reçoit fréquemment des demandes d'hygiénistes d'établissements de soins (dont particulièrement les EHPAD) pour obtenir des recommandations concernant la maîtrise de la contamination des aliments pas *Lm*.

La nouvelle difficulté de suivi des infections nosocomiales est la création de plateformes de biologie médicale dans les Centres Hospitaliers effectuant des sous-traitances et remplissant, pour les LABM clients d'origine, les fiches de renseignements du CNR.

3.2. DEMANDE DES ARS ET CIRE

En 2016 et en parallèle avec une alerte FDA sur la même catégorie d'aliment, une ARS a sollicité l'expertise de souches isolées dans une purée de pois bio contaminée à plus de 150.000 cfu/g et distribué dans 107 crèches de différents départements : Aucun cas ne fut associé.

3.3. DEPASSEMENTS DE SEUILS PFGE

En 2016, le CNRL a notifié 15 dépassements de seuils selon la méthode PFGE (16 en 2015) (défini au chapitre 2.4.1.) et correspondant à des cas groupés de 6 cas sur 6 semaines pour les profils PFGE endémiques et de 3 cas sur 6 semaines pour les profils PFGE fréquents ou rares) (Tableau 5). Cette valeur est stable depuis 2006, comprise entre 9 et 16 par an. Ces mesures ont concerné 169 souches en 2016 (315 en 2015), incluant 90 souches humaines, 77 souches alimentaires et 2 souches d'environnements agro-alimentaires.

Parmi les souches alimentaires et environnementales, 51 (65%) ont été isolées dans le cadre d'alertes-produits DGAI, ce qui est le taux le plus faible depuis 2011 (entre 85 et 91%).

Les souches humaines reliées à un dépassement de seuil de 2011 à 2015 représentaient 10 % du total des souches humaines reçues au CNRL.

La répartition des formes cliniques reliées à ces souches est stable d'année en année (N = 24%, S = 59%, A = 7% et MN = 10%). Les souches impliquées dans ces dépassements de seuil appartenaient majoritairement au groupe PCR IVb (60%), puis au groupe PCR IIa (40%) (Tableau 5). Le profil PFGE majoritaire de 2011 à 2015 était le profil endémique M-IVb-210792/210792 comme de 2006 à 2010.

Les souches impliquées dans ces dépassements de seuil appartenaient cependant à différents complexes clonaux, ne permettant pas de les relier en analyse cgMLST (Tableau 5).

En 2016, seul le dépassement L16/07 a été associé avec un aliment sur la base de l'investigation PFGE.

TABLE 5. Dépassements de seuil en 2016

Numéro	Type PFGE	Complexe Clonal	Cluster cgMLST Numéro	Types cgMLST à l'intérieur du dépassement (n)	Source alimentaire confirmé sur la base de l'investigation PFGE *
L16/01	Ila-191107-200807	CC14	FR0002	1	n.i.
L16/02	IVb-151005-151005	CC6	-	6	n.i.
L16/03	IVb-151005-111206	CC1	-	4	n.i.
L16/04	IVb-210792-210792	CC4	-	5	n.i.
L16/05	Ila-050207-050207	CC37	-	6	n.i.
L16/06	IVb-270801-050506	CC2	-	3	n.i.
L16/07	IVb-011001-160602	CC1	FR083	11	Fromage (Reblochon)
L16/08	Ila-260606-260606	CC18	-	1	n.i.
L16/09	IVb-151005-151005	CC6	-	8	n.i.
L16/10	IVb-210792-210792	CC4	-	6	n.i.
L16/11	Ila-271106-271106	CC155	FR091-093	3	n.i.
L16/12	Ila-010901-020701	CC8	-	4	n.i.
L16/13	Ila-271106-271106	CC155	-	3	n.i.
L16/14	IVb-210792-210792	CC4	-	7	n.i.
L16/15	IVb-270801-050506	CC2	-	5	n.i.

* n.i. : non identifiée

3.4. CLUSTERS CGMLST

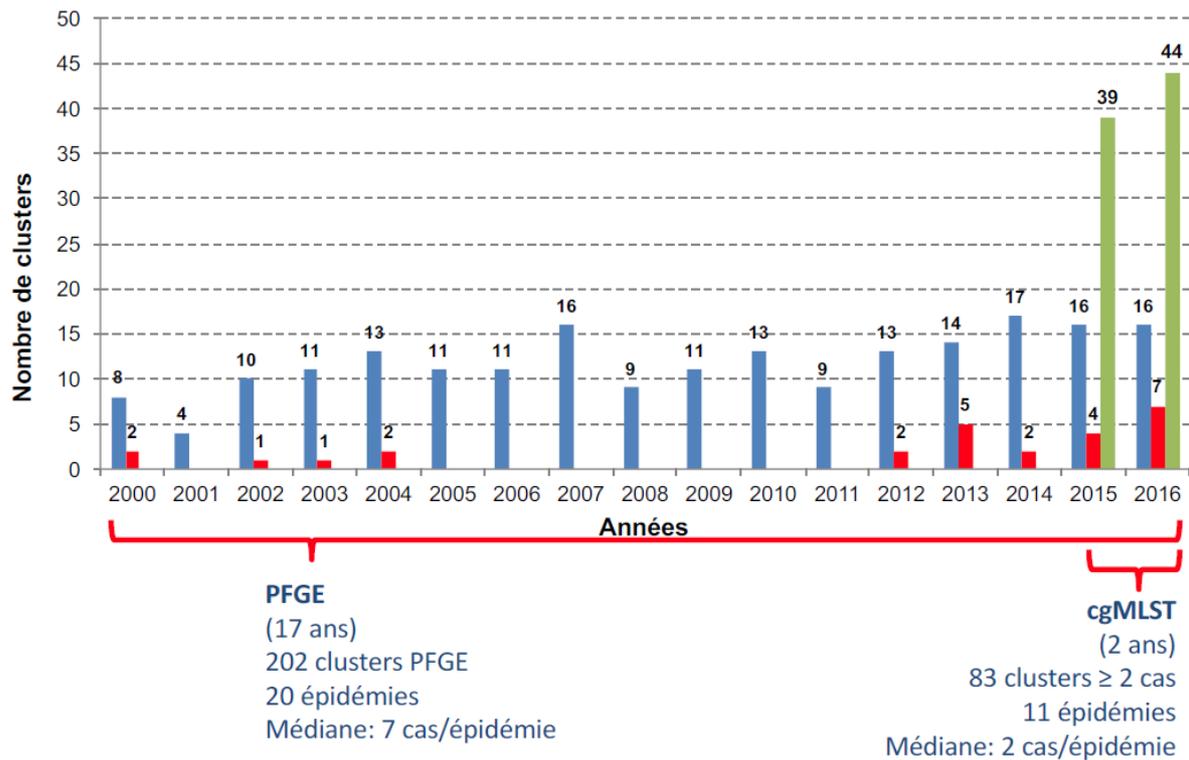
Depuis Janvier 2015, le CNRL utilise le séquençage du génome complet des souches (WGS) et la méthode de typage par MLST du core génome MLST (cgMLST), en parallèle de la méthode de typage de référence actuelle. Le but de cette comparaison était d'évaluer les performances et la praticabilité du cgMLST pour la surveillance et de connaître la valeur ajoutée de cette méthode par rapport au PFGE (Figure 20).

En 2016, 15 dépassements de seuil basés sur la méthode PFGE ont été identifiés, alors que 66 clusters de souches humaines et alimentaires ont été identifiés par la méthode de cgMLST (dont 39 incluaient plus de 2 souches humaines) (41). Cette méthode induit donc un nombre de clusters à investiguer multiplié par 4,4 par rapport au PFGE.

En conclusion, la surveillance en routine basée sur **le WGS et le cgMLST augmente très significativement la résolution du typage des souches**, en permettant la **détection de clusters qui ne sont pas mis en évidence par la PFGE et en limitant le nombre de faux positifs souvent détectés par cette méthode**. Il en découle que cette méthode permet l'identification d'un nombre plus important de clusters, et qui sont de plus petites tailles que ceux identifiés par PFGE. La meilleure résolution du cgMLST par rapport au PFGE permet d'**améliorer l'efficacité de détection des sources alimentaires liées à des infections et facilite les investigations épidémiologiques**.

Le haut pouvoir de discrimination du cgMLST permet également de s'affranchir des fenêtres temporelles et spatiales lors de l'investigation des cas groupés, qui sont nécessaires avec la méthode de PFGE compte tenu du nombre important de souches partageant des caractéristiques PFGE similaires. Le cgMLST permet ainsi de détecter des cas liés qui sont géographiquement et temporellement séparés.

Figure 20. Nombre de cas groupés identifiés par PFGE et par cgMLST. En bleu, les dépassements de seuils identifiés par PFGE. En vert, les clusters identifiés par cgMLST. En rouge, les épidémies détectées parmi ces cas groupés. (Source : SPF, M. Tourdjman, 2016)



Ces caractéristiques sont intéressantes compte tenu :

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

Le cgMLST, associé à l'exhaustivité de récupération des souches cliniques et alimentaires de *Lm* devrait permettre un fonctionnement optimal du système de surveillance français.

3.5. TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES

En Juillet 2016, une TIAC à *Lm* dans 2 EHPAD a été rapportée.

Abstract soumis mais non accepté à ESCAID 2016 sous la coordination de SPF. An outbreak of febrile gastroenteritis in two long-term care facilities, associated with *Listeria monocytogenes*-contaminated raw milk cheese — France, 2016. G. Theocharopoulos, E. Vaissière, C. Chatelet, M. Subseque, B. Mottet, A. Leclercq, G. Vales, S. Ayrat, A. Moura, M. Chapelle, M. Lefèvre, V. Ronin, E. Hamelin, M. Lecuit, M. Tourdjman.

Background Non-invasive *Listeria monocytogenes* (*Lm*)-associated febrile gastroenteritis is underdiagnosed and underreported in France where approximately 400 invasive listeriosis cases are reported annually since 2009. In July 2016, two *Lm*-meningitis cases were reported among residents of two distinct assisted-living facilities (ALF) in central France, who attended a festive meal followed by reports of febrile gastroenteritis. We investigated to identify the source of the outbreak and recommend control measures.

Methods We defined a presumptive case as fever, headache or asthenia and gastrointestinal symptoms in a resident or staff meal attendee, within 2 weeks after the meal, and a confirmed case as laboratory-confirmed *Lm* infection in a meal attendee. We conducted a retrospective cohort-study at both ALF and calculated adjusted risk ratios (aRR). Participants' stool samples were collected and tested for *Lm*. Suspected food items were tested for enteric pathogens and traced back. *Lm* isolates were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and core-genome multilocus sequence typing (cgMLST).

Results We identified 19 cases (four confirmed, 15 presumptive); four were hospitalized, one died. Twelve cases including 2 (17%) meningitis occurred among residents (median age 88 years, range 52–101) and seven among staff (median age 37 years, range 15–76). Two stool samples cultured positive for *Lm*. Raw-milk cheese consumption was associated with illness (aRR =33.7; 95% CI, 3.8–297). Traceback investigation implicated a local cheese producer; hygiene violations were identified and implicated cheeses were recalled. All human and food isolates were indistinguishable by both PFGE and cgMLST.

Conclusions Raw-milk cheese was the vehicle of this outbreak. *Lm*-gastroenteritis developed in both residents and staff whereas invasive listeriosis solely developed among residents. Serving at-risk food to at-risk population in ALF should be avoided.

3.6. EPIDEMIES

En 2016, une épidémie impliquant plusieurs cas humains a été mise en évidence par PFGE (Dépassement de seuil L16/07) et cgMLST (cluster_83) avec une association très significative ($P < 0.001$) la consommation de Reblochon contaminé par une souche de *Lm* de complexe clonal CC1. Il s'agit de la plus large épidémie depuis l'année 2000 (Tableau 7). Ce producteur, lors de cet épisode, a dû faire un retrait de 30 tonnes de reblochons.

Tableau 7. Tableau récapitulatif des épidémies françaises de 1992 à 2016

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 (tartinettes)	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
2015	8	Pélardon	2 mois
2015	3	Saint Nectaire	1 mois
2015	2	Saint Nectaire	1 mois
2015	13	Andouille – Tour de France	8 mois
2015	2	Produit corse	1,6 mois
2016	22	Reblochon	4 mois

3.7. ALERTES-PRODUITS DGAL

Ces alertes et investigations ont pour but d'identifier des souches alimentaires qui ont des caractéristiques microbiologiques similaires à celles des souches à l'origine d'infections. Les aliments faisant l'objet de ces alertes peuvent avoir diverses origines, avoir été commercialisés ou non, enregistrés par la DGAL sous la forme (i) d'une non-conformité *Listeria*, (ii) d'une notification par une Direction Départementale de Protection des Populations ou (iii) d'une notification via le réseau européen des alertes RASFF.

En 2016, 770 souches ont été adressées au CNRL dans le cadre des 338 alertes-produits DGAL et DDPP de 2016. Ces souches incluaient 687 souches alimentaires et 83 souches d'environnements agro-alimentaires. Le nombre de souches par alerte-produit variait de 1 à 31. Il faut noter que **le nombre de souches envoyées au CNRL par année dans le cadre d'une alerte-produit a presque doublé dans la période 2011-2015 (506 en 2011 vs 945 en 2015).**

En cas d'alerte RASFF, le CNRL sur la demande de la DGAL essaie d'obtenir de ses homologues étrangers les profils PFGE *Ascl/Apal* des souches *Lm* issues des aliments incriminés.

En 2016, le taux moyen d'exhaustivité de récupération des souches d'alertes-produits était de 68% alors qu'il est resté stable de 2011 à 2015, estimé à 73% en moyenne.

En 2016, 97% (comme en 2015) des souches issues d'aliments isolés dans le cadre des alertes-produits et envoyées au CNRL parce qu'elles ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Lm* par le laboratoire expéditeur ont été confirmées comme *Lm* par le CNRL.

La répartition par groupe PCR des 750 souches de *Lm* isolées d'aliments et d'échantillons environnementaux dans le cadre des alertes-produits était la suivante :

- Groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a) : 488 souches (65% ; 62% en 2015),
- Groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7) : 43 souches (6% ; 12% en 2015),
- Groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c) : 106 souches (14% ; 9% en 2015),
- Groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) : 111 souches (15% ; 17% en 2015),
- Groupe PCR IVb-V1 (sérovar 4b) : 2 souches (<1% ; 0% en 2015),
- Groupe PCR L (sérovars 4a, 4ab, 4c) : 0 souches (<1% en 2015)

3.8. ALERTES PRODUITS DGCCRF

Les 5 alertes-produits provenant de la DGCCRF ou de ses laboratoires survenus en 2016 ont donné lieu à la réception au CNRL de 12 souches. Ces alertes sont mises en place lorsque des échantillons alimentaires ne répondent pas aux critères microbiologiques règlementaires pour *Lm* lors de l'application du plan de contrôle et de surveillance pour *Listeria* et lors d'inspections (<http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/contamination-des-aliments-a-distribution-par-listeria-monocytogenes>). Depuis 2012, ces alertes-produits DGCCRF sont transformées en alertes-produits DGAL.

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

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

En 2016, 83% (72/87) des listérioses neuroméningées ont été soumises à cette d'enquête. Ce chiffre est en augmentation régulière depuis 2006 (59%). Selon les rapports communiqués par la DGAL, 24 investigations ont été suivies d'enquêtes locales donnant lieu à des prélèvements dans le réfrigérateur du patient.

En 2016, parmi les 24 cas pour lesquels des souches ont été isolées du réfrigérateur du patient, 10 reprises les caractéristiques microbiologiques de la souche du patient et de la souche isolée de son frigo étaient similaires en PFGE et en cgMLST (42).

Ainsi, les **prélèvements à domicile effectués pour les cas de listérioses neuroméningées sont un complément utile à la DO et permettent, dans environ 40% des cas où *Lm* est isolé, d'identifier rapidement la source de contamination.**

3.10. «URGENT INQUIRIES» DE L'ECDC

En 2016, le CNRL a été informé d'alertes-produits communautaires soit par l'ECDC au moyen de la plateforme EPIS, soit par la DGAI au moyen du réseau RASFF (alertes-produits), soit par l'OMS/FAO au moyen du réseau INFOSAN. À la demande de la DGAI, le CCOMS-CNRL récupère auprès d'opérateurs agro-alimentaires étrangers, les souches d'alertes-produits européennes ou internationales, ainsi que les souches des lots incriminés ayant circulé sur le territoire français. Ces souches sont alors introduites dans la surveillance nationale. Les homologues étrangers du CNRL peuvent aussi lui demander l'envoi de profils PFGE, de souches ou de génomes dans le cadre de cas groupés ou d'épidémies déclarés par la France ou de RASFF.

En 2016, le CNRL a investigué 4 « urgent inquiries » par PFGE et cgMLST (Tableau 8) de l'ECDC (communiquées sur la base EPIS) et a ouvert 1 « urgent inquiry ». Dans chaque cas, en lien avec SPF, le CNRL communique sur EPIS une synthèse des souches d'origines humaine et alimentaire ayant des profils PFGE similaires. Pour l'épidémie italienne, SPF et le CNRL ont participé à une conférence téléphonique organisée par l'ECDC dans un but d'aider l'investigation.

L'urgent inquiry française UI-344 (Dépassement de seuil L16/01) concernait un cas groupé de 4 cas humains de bactériémie à *Lm* dans le Nord de la France depuis décembre 2015 avec un profil combiné rare *Ascl/Apal* (M-IIa-191107-200807) et de cgMLST L2-CC14-ST14 (% de similarité de 99,9%). Cette demande a été faite pour savoir s'il s'agissait d'un aliment importé, mais aucun pays n'avait identifié de souche de ce type.

Aucun cas humain survenu en France n'a été relié à des souches de ces alertes-produits internationales.

Début 2016, un cas humain présentait un type cgMLST similaire à celui des souches de l'urgent inquiry de Juillet 2015 UI-300 du Danemark concernant du saumon fumé : aucune association à une source commune n'a pu être établie.

Tableau 8. Liste des Urgent Inquiries auxquelles le CNRL a participé en 2016 (Source : EPIS database, ECDC, Stockholm).

Référence	Titre	Ouverture	Pays
UI-342	Increased isolation of <i>L. monocytogenes</i> 1/2a stains with an unusual PFGE profile from patients in Central Italy	22/01/2016 10:04 PM	Italy
UI-344	Listeriosis cluster in France	09/02/2016 04:23 PM	France
UI-348	<i>Listeria monocytogenes</i> infection among persons of Eastern European descent	28/03/2016 02:10 PM	United States
UI-376	Listeriosis cluster, Germany, predominantly male	29/09/2016 11:02AM	Germany
UI-378	<i>Listeria monocytogenes</i> outbreak in the Czech Republic	05/10/2016 02:58 PM	Czech Republic

3.11. ECHANGE SUR DES ALERTES AVEC D'AUTRES ORGANISMES DE SANTE PUBLIQUE EUROPEEN

Le Robert Koch Institute (Berlin) a contacté en février 2016 SPF et le CNR concernant un cluster de 4 cas (Dec 2015-Janv 2016) dans le Land Bade-Wurtemberg près de la frontière alsacienne. Aucune association n'a pu être établie avec les cas survenus dans le Nord-Est de la France impliquant des souches de mêmes caractéristiques microbiologiques. Les Autorités compétentes du Portugal ont été interrogées par SPF à propos d'un patient ayant développé une forme neuroméningée en avril 2016 après consommation d'un fromage acheté durant un voyage au Portugal. Les profils PFGE *Ascl/Apal* et cgMLST Type du lot de fromage consommé par le cas étaient similaires à celui du patient. Les autorités compétentes portugaises ont confirmé que le lot consommé avait bien été notifié comme contaminé à 100 ufc/g.

3.12. ENQUETE JUDICIAIRE

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

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

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

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

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* dispose d'une collection d'articles papier de 1956 à 2000 sur *Listeria* et un accès aux bases de données en ligne pour les articles de 2000 à nos jours, ainsi qu'une collection d'ouvrages de référence et de données historiques. Les chercheurs, étudiants, praticiens ou hygiénistes qui en font la demande peuvent consulter ce centre de documentation. Chaque année, le CNR procure environ 60 documents pour des chercheurs ou praticiens ou opérateurs agro-alimentaires.

4.1. ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS, ACCUEIL DE STAGIAIRES

Les membres du CNRL animent chaque année de multiples formations microbiologiques médicales et agro-alimentaires : diplômes universitaires médicaux, formation médicale initiale des obstétriciens et infectiologues, formation de chefs de laboratoires, techniciens, responsables qualité du secteur agro-alimentaire et hygiénistes des hôpitaux organisées par l'Institut Pasteur de Lille, formation organisée par ADRIA Développement, séminaires de formation continue au sein de services hospitalo-universitaires d'Obstétrique, de Médecine Interne ou de Maladies Infectieuses sur différents sujets ayant trait à la listériose. Le CNRL participe également à des conférences aux niveaux national et international (cf. chapitre 5).

En 2016, le CNRL a continué d'accueillir le Dr. Alexandra MOURA (depuis 2014), chercheur post-doctorante dont le projet s'intitule « **Génomique des populations des souches de *Listeria monocytogenes*** ».

4.2. PARTICIPATION A LA REDACTION DE COMMUNICATIONS ECRITES DIDACTIQUES

Le CNRL a participé à l'élaboration des chapitres de livres ou de revues didactiques listés dans le chapitre 5 pour les professionnels de santé et de l'agro-alimentaire.

4.3. RETOUR D'INFORMATIONS

Le retour d'information prend plusieurs formes :

1. Compte-rendu détaillé des analyses effectuées pour chaque souche envoyée au laboratoire expéditeur. En cas d'atypies sur la souche ou si le cas clinique est atypique, le laboratoire expéditeur est contacté par l'un des responsables pour échanges d'informations ou études complémentaires éventuelles.
2. Publication d'articles didactiques en langue française: en 2016, numéro hors-série du bulletin épidémiologique hebdomadaire avec SPF (31, 43), synthèse sur la « *listériose humaine : une zoonose d'origine alimentaire* », publiée dans la Revue Francophone des Laboratoires (44).
3. Communications orales à de multiples congrès nationaux et internationaux des travaux de recherche du CNRL (congrès mondial *Listeria* ISOPOL 2016, congrès européen de Maladies Infectieuses en 2016, réunion multidisciplinaire de chimiothérapie infectieuse (RICAI) en 2016).

Depuis 2007, le rapport d'activité du CNRL (version web) 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.

4.4. SITE INTERNET

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* dispose d'un site internet en français et anglais : (<http://www.pasteur.fr/cnr/listeria>), qui est incorporé dans le site des CNR de l'Institut Pasteur formant le LREMS (Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite).

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

4.5. VEILLE INTERNET

Le CNRL/CCOMS des *Listeria* est abonné à plusieurs réseaux d'alertes de santé humaine et alimentaire. Les cadres du CNRL participent au Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M) afin de répondre, le cas échéant, à toutes questions spécifiques sur la listériose ou toutes demandes de bibliographie sur ce sujet. Le CNRL répertorie l'ensemble des sites Internet en langue française afin de solliciter des modifications de données erronées, ajouter un complément d'informations ou effectuer un lien avec le site Internet du CNRL. Le CNRL effectue également une veille continue de la consultation des termes *Listeria*/listérioses sur Google et Twitter pour détecter un phénomène anormal non rapporté.

4.6. ACTIVITE DE CONSEIL

En 2016, le CNRL a reçu en moyenne 235 demandes d'information par e-mail (listeria@pasteur.fr) (~5/semaine) et environ 420 appels téléphoniques (~8/semaine) (cf. point 4.7 "Prestations de conseils » de la norme NF EN ISO 15189) et point 4.4. "Revue de contrat » de la norme NF EN ISO 17025). Cette activité de conseils a été évaluée pour la partie médicale par les évaluateurs techniques COFRAC en Janvier 2017.

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

Professionnels de santé

- demandes de renseignements concernant l'envoi de souche
- demandes de conseils microbiologiques (prélèvements biologiques à réaliser, isolement, identification, typage des souches, et/ou interprétation des résultats)
- demandes d'aide au diagnostic (stratégie diagnostic, réalisation d'antibiogramme, diagnostic complémentaire par PCR et/ou sérologie)
- demandes de conseils thérapeutiques (ex : alternative thérapeutique en cas d'allergie aux β -lactamines)

Professionnels de l'alimentaire

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

Particuliers

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

4.7. EXPERTISES

Expertises de souches

En 2016, le CNRL a reçu 202 souches isolées de patients ou d'aliments adressées par des laboratoires de pays étrangers ou de produits importés pour expertise.

Le CNRL a également reçu 260 souches d'origine environnementale et/ou alimentaire (279 en 2015) adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour identification et caractérisation (prestations payantes).

Les responsables du CNRL sont sollicités pour participer à des réunions nationales ou internationales en temps qu'experts. Le CNRL est aussi régulièrement sollicité pour des demandes d'expertise sur des dossiers spécifiques de listériose, ou pour le typage moléculaire de souches isolées de l'environnement ou d'aliments.

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

En 2016, les responsables du CNRL ont participé aux réunions sur la révision des normes françaises, européennes et internationales pour les *Listeria* en microbiologie de la chaîne alimentaire. Ils ont également participé à l'harmonisation européenne (ECDC/EFSA) et internationale (Pulsenet) des méthodes de groupage PCR et de typage moléculaire par génomique des *Lm*. Le CNRL a également expertisé deux méthodes alternatives de détection des *Listeria* à la demande de l'Afnor Certification et de la DGAI.

Expertise de publications et de projets scientifiques

En 2016, le CNRL a participé à l'examen de plus de 14 articles dans des journaux nationaux et internationaux à comités de lecture (PloS One, Epidemiology and Infection, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Frontiers in Microbiology, International Journal of Food Microbiology, Foodborne Pathogens and Disease, Food Microbiology, Journal of Food Protection, J. Applied Microbiology, etc.). Il a également expertisé des projets scientifiques.

C. Charlier Woerther est Editeur pour la section « Maladies Infectieuses » de 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, en tant qu'experts ou conseillers, à différentes instances : ECDC groupe *Listeria*, groupe de travail permanent de la Coordination des Laboratoires de Référence et d'Expertise (Institut Pasteur), Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M), Comité Européen de Normalisation en microbiologie de la chaîne alimentaire CEN TC275/WG6, Comité français Afnor V08B, Comité International de normalisation en microbiologie des aliments ISO TC34/SC9, Comité d'experts spécialisés CES « BIORISK » de l'ANSES. En 2016, A. Leclercq a participé aux groupes d'experts ANSES sur l'attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire » et le CNRL a été auditionné dans ce cadre sur la surveillance et la disponibilité des données et métadonnées disponibles en France. En 2016, la DGAI (C. DANAN) a demandé au CNRL d'assister deux étudiantes d'AgroParisTech en Master 2 pour l'établissement d'une fiche web de la DGAI sur *Listeria monocytogenes* avec les liens vers les données publiques dans le secteur alimentaire, vétérinaire et humain.

Conseil auprès de Ministères

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. Il contribue à la préparation d'avis de l'ANSES.

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

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

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

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

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

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

5.1. CONTRIBUTIONS AUX ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

Investigations alimentaires et d'environnements agro-alimentaires des cas sporadiques de listériose invasive survenus en France entre 2003 et 2015

En collaboration avec Mathieu Tourdjman (SPF)

Poster M. Tourdjman, A. Leclercq, E. Laurent, V. Goulet, N. Fredricksen, M.P. Donguy, H. De Valk, M. Lecuit. 2016. Food and Environmental investigations of sporadic invasive listeriosis cases – France, 2003-2015. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 138

Abstract: Central nervous system (CNS) and non-pregnancy-related bacteremic listeriosis have been associated with short incubation period. Testing of foods available in the immediate vicinity of those cases can identify contaminated products.

In France, for CNS cases, food and environmental investigations are conducted at the patient's house since 2003 and within healthcare facilities when hospital acquisition is suspected. Since 2011, investigations at healthcare facilities are also conducted for bacteremic cases suspect of hospital acquisition. We present the results of these investigations for 2003–2015.

We defined a case as the isolation of *Listeria monocytogenes* (*Lm*) from blood or cerebrospinal fluid in a non-pregnant person in France, from Jan 2003 to Dec 2015. We considered possible hospital acquisition for inpatients developing listeriosis at least 15 days following admission. Officers of the Ministry of Agriculture sampled available at-risk foods from the patient's fridge for CNS cases, and inspected and sampled the hospital kitchen for both CNS and bacteremic cases with possible hospital acquisition. Further samplings at patronized points of sales were left at the discretion of the officers if relevant. Isolated strains were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and compared with the human isolate.

1023 CNS cases were reported during 2003–2015 and 1001 bacteremic cases were reported during 2011–2015, of which 73 (7.3%) were considered possibly hospital-acquired. Food and environmental investigations were performed for 487 (48%) CNS cases and included 426 (42%) household fridge investigations, 34 (3%) hospital kitchen investigations and 85 (8%) point of sales investigations (multiple investigations possible). Respectively, 97 (23%), 11 (32%) and 38 (45%) fridge, hospital and point of sales investigations yielded *Lm* isolation. PFGE-matching strains were found in 44 (45%) fridge investigations, 3 (27%) hospital kitchen investigations and 13 (34%) point of sales investigations. Hospital kitchen investigations were conducted for 13 (18%) bacteremic cases with possible hospital acquisition, none yielded *Lm* isolation.

Food and environmental investigations of CNS cases during 2003–2015 contributed to identifying the vehicle of contamination. Investigations of bacteremic cases suspect of hospital acquisition did not identify any source of contamination. Given the cost-effectiveness of these investigations, the relevance of this strategy should be evaluated.

Etude de la contamination du beurre et impact en santé publique

En collaboration avec D. Michelon (EURL *L. monocytogenes*), H. Bergis (EURL *L. monocytogenes*) et A. Beaufort (EURL *L. monocytogenes*).

Article publié: Michelon, D., Leclercq, A., Garric, G., Guillier, L., Beaufort, A., Bergis, H. 2016, Growth Potential Assessment of *Listeria* in Milk Fat Products by Challenge Testing. *Journal of Food Safety*. 36: 260–270.

Abstract: Milk fat products (MFP), including butter and low-fat dairy spreads, are a specific type of ready-to-eat food known as water-in-fat emulsions, in which the behavior of microbial foodborne pathogens such as *Listeria monocytogenes* is not clearly known. This study investigated the growth and survival of *L. monocytogenes*, and of *Listeria innocua* as a surrogate for *L. monocytogenes*, in these foods using challenge testing. Three commercial MFPs with various fat contents (butter, half butter and low-fat dairy spread) and two samples of traditional churned butter with various water droplet sizes were artificially contaminated with *Listeria*. Total mesophilic microflora including lactic acid bacteria, pH and *Listeria* were monitored throughout the shelf life. The growth potential of *Listeria* was calculated in the course of the shelf life and remains below the limit value of 0.5 log cfu/g during the whole shelf life in any of the butter. However, the concentration of *Listeria* remained stable during the shelf life in the tested MFPs (commercial and churned) except in the commercial low-fat dairy spread in which *Listeria* decreased gradually.

Changements épidémiologiques et surveillance de la listériose en France

En collaboration avec H. De Valk et M. Tourdjman (SPF)

Présentation orale à ISOPOL Paris 2016. H. De Valk, M. Tourdjman, A. Leclercq, M. Maury, A. Moura, V. Chenal-Francisque, V. Goulet, S. Brisse, M. Lecuit. *Changes in epidemiology and surveillance of listeriosis in France*.

Abstract: Invasive listeriosis is a notifiable disease in France since 1999. Incidence of culture-confirmed *Listeria monocytogenes* (*Lm*) infection has declined dramatically over the past decades, primarily because of food safety measures in the food industry. The incidence was lowest between 1999 and 2005, about 0.37 per 100,000 persons. Since 2006, incidence has increased steadily to 0.62 per 100,000 persons in 2015, although it varies by risk group and underlying conditions. The incidence among pregnant women has remained stable at 4.9 per 100,000.

The enhanced listeriosis surveillance system relies on the Institute for Public Health Surveillance that collects epidemiological data and food histories from all patients with *Lm* infection, and the National Reference Center (NRC) for *Listeria* that centralizes all human isolates, ensures molecular subtyping and microbiological surveillance. Food and environmental investigations are systematically carried out in the refrigerators of patients with central nervous system infection and in hospital kitchens in case of hospital-acquired infection.

Between 1999 and 2015, molecular subtyping by using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has been the corner stone of molecular surveillance and contributed to multiple outbreaks identification that led to food safety improvements. Nevertheless, raw milk cheeses and processed meat products remain the most frequently implicated vehicles in outbreaks. Since 2015, sequencing analysis by using core-genome multilocus sequence typing (cgMLST) has been developed and performed in parallel with PFGE by the NRC on all *Lm* isolates collected on patients as well as on isolates of food and environmental origin.

Parallel implementation of PFGE and cgMLST-based surveillance has changed the way outbreaks are detected and investigated. Using the increased discriminatory capacity of cgMLST typing, more clusters of fewer cases have been identified, and several unsolved PFGE clusters were shown to be pseudo-clusters. The majority of listeriosis cases were confirmed as sporadic.

As a result of these improvements, clusters are more numerous and smaller creating novel challenges for epidemiologists and emphasizing the importance of high-quality interviews using questionnaires that encompass an increasing number of newly identified vehicles. In the meantime, increasing collaboration between public health and regulatory agencies is needed to sometimes initiate control measures at a lower level of epidemiological evidence.

Epidémie nosocomiale de listériose liée à une contamination prolongée de l'environnement de la cuisine hospitalière - France, 2013

En collaboration avec Mathieu Tourdjman (SPF)

Poster M. Tourdjman, A. Leclercq, C. Groleau, L. Soyer, A. Moura, E. Laurent, M.P. Dongy, G. Coan, D. Legoff, S. Brisse, M. Lecuit, H. De Valk. 2016. Hospital-acquired listeriosis outbreak linked to prolonged contamination of a hospital kitchen environment. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 137

Abstract: Hospital-associated listeriosis outbreaks have been reported worldwide and have primarily been linked to consumption of distributed contaminated foods. By investigating a cluster of two listeriosis cases among hospitalized patients in February 2013, we identified a hospital associated outbreak that spanned over 2 years.

We defined a case as a laboratory-confirmed *L. monocytogenes* (*Lm*) infection with the pulse-field gel electrophoresis (PFGE) outbreak pattern diagnosed in Northwestern France between 2011 and 2014.

We queried the *Listeria* National Reference Center (NRC) database to identify cases. We reviewed patients' records and food consumption histories. We inspected the kitchen of the implicated hospital and tested food and environmental samples for *Listeria*. Isolates were PFGE subtyped and patterns were compared with the outbreak pattern. Strains were subsequently sequenced by using core genome multilocus sequence typing (cgMLST).

Seven cases were identified among residents of Northwestern France. Onsets ranged from July 2011 to Sept. 2013. Median age was 83 years (range: 59–91); 6 patients were female. All patients had underlying conditions and presented with bacteremia, none of them died. All patients had been exposed to Hospital A during their incubation period during a median of 20 days (range: 2–30). Food and environmental sampling of the hospital kitchen yielded the outbreak strain.

In April 2013, extensive cleaning and disinfection of the kitchen was implemented and infrastructures were replaced. Following the identification of a new case in Sept. 2013, further environmental sampling of the kitchen yielded the outbreak strain again. The kitchen was later closed, major works were done and hygiene protocols were modified. Additional extensive sampling performed after reopening did not identify the outbreak strain and no new case has been reported since then. Retrospective cgMLST analysis confirmed the similarity of the human, food and environmental strains.

Prolonged contamination of the hospital kitchen environment was the source of this hospital-acquired listeriosis outbreak that spanned over more than 2 years. Retrospective and thorough analysis of matching cases over a prolonged period should be considered to identify hospital-acquired cases. Real-time cgMLST-based surveillance will increase the likelihood of detecting such events that could otherwise be missed.

Surveillance génomique de Listeria monocytogenes en 2015-2016 en France

En collaboration avec S. Brisse, Unité de génomique évolutive des microbes, Institut Pasteur, et M. Tourdjman, H. De Valk (SPF).

Poster A. Moura, A. Leclercq, H. Bracq-Dieye, P. Thouvenot, G. Vales, M. Maury, H. De Valk, A. Criscuolo, V. Enouf, S. Brisse, M. Lecuit. 2016. Genome-based surveillance of *L. monocytogenes* in France in 2015. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 58. Article soumis.

Abstract: Background Listeriosis is a notifiable disease in France. In 2015, we implemented whole-genome sequencing (WGS) in parallel with the current standard pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to evaluate WGS typing performance and its added value on epidemiological investigations of listeriosis. Methods: 1,437 *Listeria monocytogenes* (*Lm*) isolates (401 clinical isolates and 1,036 from food or food-processing plants) were prospectively collected in 2015 and subjected to both molecular typing by PFGE and WGS. Core genome MLST (cgMLST) was used to infer phylogenetic relationships. Multilocus sequence typing (MLST), PCR-serogrouping, virulence and resistance profiles were extracted from genomic data.

Results: The median time to results was 7 days for PFGE and 9 days for WGS. Discrimination of isolates using cgMLST was significantly higher than with PFGE ($p < 0.001$). cgMLST allowed to discriminate distinct clusters among isolates with identical PFGE profiles and to detect phylogenetically closely related isolates having different PFGE profiles. This resulted in a 2.5-fold increase of estimated linked clusters (59 using cgMLST versus 16 using PFGE, $p < 0.001$), containing significantly lower number of isolates per cluster (3 in cgMLST versus 13 in PFGE, $p < 0.001$). This allowed

discarding false-positives isolates from epidemiological investigations, and led to a 5-fold improvement in source identification.

Conclusions: This study demonstrates that WGS greatly improves *Lm* subtyping resolution, and allows identifying narrower and accurate clusters that strengthen epidemiological investigations. WGS also allows to analyze the genetic diversity of circulating strains and to detect outbreak at earlier stages. WGS should replace PFGE for accurate *Lm* surveillance.

Article soumis : Alexandra Moura, Mathieu Tourdjman, Alexandre Leclercq, Estelle Hamelin, Edith Laurent, Nathalie Fredriksen, Dieter Van Cauteren, Hélène Bracq-Dieye, Pierre Thouvenot, Guillaume Vales, Nathalie Tessaud-Rita, Mylène M. Maury, Andrea Alexandruu, Alexis Criscuolo, Emmanuel Quevillon, Marie-Pierre Donguy, Vincent Enouf, Henriette de Valk, Sylvain Brisse, Marc Lecuit. 2016. Impact of whole genome sequencing on Listeria monocytogenes microbiological and epidemiological surveillance: a two-year prospective study in France.

ABSTRACT

Background: Listeriosis is a notifiable disease in France. In 2015, we implemented whole-genome sequencing (WGS) to evaluate its performance as a routine typing tool and its added value on microbiological and epidemiological surveillance of listeriosis, compared with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), the current standard method.

Methods: During 2015–2016, 2,743 *Listeria monocytogenes* (*Lm*) isolates, including 770 human and 1,973 food or food production environments isolates were collected as part of routine surveillance, and characterized in parallel by PFGE and core genome multilocus sequence typing (cgMLST) extracted from WGS. PFGE- and cgMLST-clusters containing human isolates were investigated and compared.

Results: Discrimination of isolates was significantly higher using cgMLST than PFGE ($p < 0.001$). cgMLST allowed (i) identifying phylogenetically unrelated isolates that share identical PFGE profiles and (ii) detecting phylogenetically closely related isolates with distinct PFGE profiles. The use of cgMLST-based clustering resulted in a 3.8-fold increase of human clusters compared with PFGE (119 cgMLST versus 31 PFGE clusters). cgMLST clusters contained lower numbers of human isolates per cluster (median: 2 isolates in cgMLST versus 6 in PFGE clusters). cgMLST allowed to narrow epidemiological investigations to phylogenetically closely related isolates.

Conclusions: WGS greatly improves *Lm* subtyping resolution, and allows more accurate cluster identification. This narrows, and thereby facilitates, epidemiological investigations and improves source identification. WGS also reveals the genetic diversity of circulating *Lm* strains and allows detecting more outbreaks at earlier stages. WGS should therefore replace PFGE as the primary typing method for *Lm* surveillance.

5.2. METHODES DE DIAGNOSTIC ET CARACTERISATION DES SOUCHES ATYPIQUES

Souches de Listeria monocytogenes non hémolytiques

En collaboration avec M. Scotti et J.A. Vazquez-Boland, University of Edinburgh, Ashworth Laboratories, Edinburgh, Royaume-Uni.

Poster H. Bracq-Dieye, V. Chenal-Francisque, M. Maury, L. Han, A. Leclercq, M. Scotti, O. Disson, E. Gouin, J.A. Vazquez-Boland, M. Lecuit. 2016. Characterization of non-haemolytic Listeria monocytogenes isolates, impact on virulence. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 179

Article soumis : Hélène Bracq-Dieye, Viviane Chenal-Francisque, Mylène M. Maury, Lei Han, Alexandre Leclercq, Alexandra Moura, Mariella Scotti, Olivier Disson, Edith Gouin, Jose Antonio Vázquez-Boland, Marc Lecuit 2016. Spontaneous virulence attenuation in natural populations of Listeria monocytogenes revealed through the screening of non-hemolytic mutants.

Abstract: *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a facultative intracellular pathogen that escapes from the phagosome of host cells by the action of the pore-forming toxin listeriolysin O (LLO). LLO is encoded by a gene (*hly*) located in the *Listeria* Pathogenicity Island 1 (LIPI-1), whose transcription is regulated by PrfA in presence of glutathione. The β -haemolysis activity of *Lm* conferred by LLO is a key phenotypic marker for *Lm* identification in clinical and food microbiology. Here we have characterized 60 spontaneous non-hemolytic *Lm* isolates among the 68,952 *Lm* strains collected between 1987 and 2008 from food, production environment and human sources in the context of *Lm* surveillance. Molecular investigations and whole genome analysis reveal that the decreased hemolytic activity can result from nonsense,

missense and frameshift mutations in *prfA* (56/60), and/or rarely in *hly* (5/60), leading to PrfA and/or LLO loss of function, respectively. In a single isolate from a human clinical case, both *hly* and *gshF* (responsible for the biosynthesis of glutathione) were absent due to genomic rearrangements likely caused by a transposable element present in eight copies in the genome of this strain. Strains with a wild type PrfA and harboring a G299V substitution or a premature stop codon at position 484 in LLO, as well as a strain producing a longer and non-functional PrfA, exhibited a strongly attenuated virulence in mice. Our results highlight the wide range of independent genetic events that lead to the loss of *Lm* hemolytic activity, which is almost exclusively observed in non-clinical strains (57/60). Clinical and food microbiologists should not rule out *Lm* in front of non-hemolytic Gram-positive bacilli, although non-hemolytic *Lm* prevalence is extremely low (0.06 %).

5.3. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES, MICROBIOLOGIQUES ET CLINIQUES

Etude MONALISA: Multicentric Observational National Analysis of Listeriosis and Listeria

Présentation Orale : C. Charlier, E. Perrodeau, A. Leclercq, V. Goulet, P. Ravaud, M. Lecuit. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA study. ISOPOL, Paris, 2016.

Article: Charlier C, Perrodeau É, Leclercq A, Cazenave B, Pilmis B, Henry B, Lopes A, Maury MM, Moura A, Goffinet F, Dieye HB, Thouvenot P, Ungeheuer MN, Tourdjman M, Goulet V, de Valk H, Lortholary O, Ravaud P, Lecuit M; MONALISA study group. 2016. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. Lancet Infect Dis. 2017 Jan 28. pii: S1473-3099(16)30521-7. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30521-7

Abstract:

BACKGROUND: Listeriosis is a severe foodborne infection and a notifiable disease in France. We did a nationwide prospective study to characterise its clinical features and prognostic factors.

METHODS: MONALISA was a national prospective observational cohort study. We enrolled eligible cases declared to the National Reference Center for Listeria (all microbiologically proven) between Nov 3, 2009, and July 31, 2013, in the context of mandatory reporting. The outcomes were analysis of clinical features, characterisation of Listeria isolates, and determination of predictors of 3-month mortality or persisting impairment using logistic regression. A hierarchical clustering on principal components was also done for neurological and bacteraemic cases. The study is registered at ClinicalTrials.gov, number NCT01520597.

FINDINGS: We enrolled 818 cases from 372 centres, including 107 maternal-neonatal infections, 427 cases of bacteraemia, and 252 cases of neurolisteriosis. Only five (5%) of 107 pregnant women had an uneventful outcome. 26 (24%) of 107 mothers experienced fetal loss, but never after 29 weeks of gestation or beyond 2 days of admission to hospital. Neurolisteriosis presented as meningoencephalitis in 212 (84%) of 252 patients; brainstem involvement was only reported in 42 (17%) of 252 patients. 3-month mortality was higher for bacteraemia than neurolisteriosis (hazard ratio [HR] 0.54 [95% CI 0.41-0.69], $p < 0.0001$). For both bacteraemia and neurolisteriosis, the strongest mortality predictors were ongoing cancer (odds ratio [OR] 5.19 [95% CI 3.01-8.95], $p < 0.0001$), multi-organ failure (OR 7.98 [4.32-14.72], $p < 0.0001$), aggravation of any pre-existing organ dysfunction (OR 4.35 [2.79-6.81], $p < 0.0001$), and monocytopenia (OR 3.70 [1.82-7.49], $p = 0.0003$). Neurolisteriosis mortality was higher in blood-culture positive patients (OR 3.67 [1.60-8.40], $p = 0.002$) or those receiving adjunctive dexamethasone (OR 4.58 [1.50-13.98], $p = 0.008$). **INTERPRETATION:** The severity of listeriosis is higher than reported elsewhere. We found evidence of a significantly reduced survival in patients with neurolisteriosis treated with adjunctive dexamethasone, and also determined the time window for fetal losses. MONALISA provides important new data to improve management and predict outcome in listeriosis.

FUNDING: Programme Hospitalier Recherche Clinique, Institut Pasteur, Inserm, French Public Health Agency.

A la suite de cette étude, nous étudions 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 a débuté en 2015 (CRC AP-HP 80k€), et permettra d'établir, s'il existe chez ces enfants, des séquelles à long terme, et le rôle respectif de la prématurité, du sepsis et de l'infection du système nerveux central (collaboration avec PY Ancel, responsable de la cohorte EPIPAGE2).

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

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

Le CNRL participe au recueil prospectif des données microbiologiques des souches de *Listeria* pour les patients inclus dans l'étude. (34 cas inclus à ce jour).

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 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.

Recherche biomédicale R-GNOSIS

En collaboration avec Dr M. Benhayoun & J.L. Ecobichon, Hopital Bichat-Claude Bernard, APHP
Personnes impliquées au CNRL : A. Leclercq – M. Lecuit

Depuis 2011, le projet de recherche collaboratif européen (FP7) R-GNOSIS (Resistance in Gram-Negative Organisms: Studying Intervention Strategies) développe un essai visant à décoloniser des patients porteurs d'entérobactéries multirésistantes avec des concentrations élevées d'antibiotiques topiques et une recolonisation des intestins avec des microbiotes fécaux. Le CNRL procède à l'expertise des échantillons de selle des donneurs candidats pour la détection de *Lm* viables pour que la pharmacie à usage intérieure puisse valider et délivrer le transplant servant à la recolonisation des intestins avec des microbiotes fécaux.

Isolement de *Listeria monocytogenes* d'urines : analyse de 14 cas

*Poster F. Danion, A. Leclercq, M. Maury, M. Lecuit, C. Charlier. 2016. Isolation of *L. monocytogenes* from urine: analysis of 14 cases. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 199*

*Article: Danion F, Maury MM, Leclercq A, Moura A, Perronne V, Léotard S, Dary M, Tanguy B, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Lecuit M, Charlier C. 2016. *Listeria monocytogenes* isolation from urine: a series of 15 cases and review. Clin Microbiol Infect. 2017 Jan 18. pii: S1198-743X(17)30016-2. doi: 10.1016/j.cmi.2017.01.007.*

Abstract: *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a foodborne pathogen typically responsible for severe infections in immune-depressed patients, like septicemias, neurological or maternal–neonatal infections. The identification of *Lm* in the urine has never been extensively assessed.

Surveillance of listeriosis in France is based on mandatory reporting of cases to the Institut de Veille Sanitaire and voluntary submission of *Lm* strains to the National Reference Center for *Listeria* (NRCL). We undertook a retrospective study of cases reported to the NRCL from 01/1995 to 03/2016 with *Lm* in urine cultures. Isolates were genotyped.

Fourteen patients with *Lm* isolated from urine were identified. Eleven were men. Median age was 78 years (range [40-90]). All patients were older than 65 or had immunosuppressing condition(s) (cancer (n=5), alcoholism (n=4) diabetes mellitus, autoimmune disorder or cirrhosis (n=2, each)). Six patients reported prostatic lesions (adenoma (n=4) or adenocarcinoma (n=2)); two reported previous or concomitant uropathies: previous renal tuberculosis and enterovesical fistula (n=1, each).

Clinical presentation identified 3 groups. Seven cases (50%) had *Lm* urinary tract infections: prostatitis (n=6) or pyelonephritis (n=1); they reported fever with no alternative cause and urinary tract symptoms or high PSA levels; symptoms all resolved under amoxicillin therapy (15-28 days). *Lm* was the only pathogen identified, except in the case with enterovesical fistula.

Two patients (14%) reported fever without urinary symptom or ultrasound evidence for prostatic/kidney infection. They both had concomitant positive blood culture for *Lm*: *Lm* isolation in this context likely reflects concomitant bacteremia rather than primary urinary tract infection.

Five patients (36%) were completely asymptomatic. Blood cultures were negative (3/3). No infection was reported after 2-months follow-up despite therapeutic abstention (n=4) or ineffective treatment with nitrofurantoin (n=1). *Lm* isolation in urine in this context likely reflects fecal contamination, rather than actual infection.

Isolation of *Lm* in the urine may reflect 3 distinct conditions: (1) urinary tract infection that can be considered as a rare but actual entity, (2) complicating septicemia and (3) asymptomatic colonization/contamination. It requires careful evaluation and work-up that should include blood cultures.

Diagnostic et traitement des endophtalmies à Listeria monocytogenes

Etude réalisée avec l'ECDC

Article : Chersich MF, Takkinen J, Charlier C, Leclercq A, Adams PE, Godbole G, Altmeyer U, Friesema IH, Labbé Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter F, Luchters SM, Lecuit M, Cimino L. 2016. *Diagnosis and Treatment of Listeria monocytogenes Endophthalmitis: A Systematic Review. Ocul Immunol Inflamm.* 2017 Feb 1:1-10. doi: 10.1080/09273948.2016.1276788

Abstract

PURPOSE: Describe patient characteristics, treatment, and vision outcomes of *Listeria monocytogenes* endophthalmitis, an exceedingly rare form of listeriosis.

METHODS: *L. monocytogenes* endophthalmitis cases in human adults, located through Medline (32) and from disease surveillance centers (11). *L. monocytogenes* conjunctivitis and keratitis were excluded.

RESULTS: Most cases occurred in 2000-2015 (22/43), and almost all in Europe or North America (40/43). Patients were a median 61 years, 57% male (24/42) and half were immunosuppressed. Median days from entering care to diagnosis was 8 (IQR = 5-17). Only four were exogenous infections. *L. monocytogenes* was identified in 31/35 of anterior eye fluid samples (89%). Antibiotic regimens varied markedly (mostly ≥ 3 drugs). At diagnosis, most were blind in the affected eye (85%, 28/33), only a third regained normal vision (12/36). Older patients had poorer outcomes.

CONCLUSIONS: Cases increased over time. Diagnostic delays were common and visual impairment often refractory to treatment, especially in older adults. The condition's rarity and variation in treatment makes it difficult to identify optimum therapy.

5.4. ETUDES DE LA VIRULENCE

Etude comparative de la neurolistériose humaine et du ruminant (Sinergia, Swiss National Science Foundation)

En collaboration avec J. Frey et A. Oeverman (Institute of veterinary Bacteriology, University of Bern, Switzerland) et S. Brisse (Unité de Génomique évolutive des Microbes)

Neurolisteriosis is a common and frequently fatal complication of *Listeria monocytogenes* infection in human and ruminants. It has a high impact on human and animal health, but only little is known about its pathogenesis. Intriguingly, neurolisteriosis apparently occurs in various phenotypes. In ruminants only rhombencephalitis occurs, whilst humans may be affected by meningitis, meningoenophthalmitis, brain abscesses and rhombencephalitis.

This project aims to study comparatively and integratively human and ruminant neuroinfection on the level of the host (neuroinfection phenotypes), pathogen (microbiology) and experimental models (molecular pathophysiology of neurotropism). The correlation of human and ruminant clinical and neuropathology data with genetic data of the field strains and their investigation in experimental models will allow to identify the factors that determine neurotropism and invasion. To this end, we will exploit the apparent similarities and differences in ruminant and cattle neuroinfection that indicate the ability of *L. monocytogenes* to reach the brain by various strategies. Unraveling how *L. monocytogenes*, a widely studied model pathogen, targets the central-nervous system via various pathways is crucial to understand the principles of brain invasion by intracellular microbes.

This project is expected to enable the future development of new therapeutic strategies that aim to prevent *L. monocytogenes* from invading and spreading within the central-nervous system. Additionally, it will generate important information on the molecular epidemiology and phylogeny of human and ruminant *L. monocytogenes* neurotropic strains. This will enable future studies investigating the spread of neurotropic strains in the livestock population, environment and food and will facilitate surveillance and prevention of infection in both ruminants and humans.

Article: Dreyer M, Aguilar-Bultet L, Rupp S, Guldemann C, Stephan R, Schock A, Otter A, Schüpbach G, Brisse S, Lecuit M, Frey J, Oevermann A. 2016. *Listeria monocytogenes* sequence type 1 is predominant in ruminant rhombencephalitis. *Sci Rep.* 2016 Nov 16;6:36419. doi: 10.1038/srep36419.

Abstract: *Listeria (L.) monocytogenes* is an opportunistic pathogen causing life-threatening infections in diverse mammalian species including humans and ruminants. As little is known on the link between strains and clinicopathological phenotypes, we studied potential strain-associated virulence and organ tropism in *L. monocytogenes* isolates from well-defined ruminant cases of clinical infections and the farm environment. The phylogeny of isolates and their virulence-associated genes were analyzed by multilocus sequence typing (MLST) and sequence analysis of virulence-associated genes. Additionally, a panel of representative isolates was subjected to in vitro infection assays. Our data suggest the environmental exposure of ruminants to a broad range of strains and yet the strong association of sequence type (ST) 1 from clonal complex (CC) 1 with rhombencephalitis, suggesting increased neurotropism of ST1 in ruminants, which is possibly related to its hypervirulence. This study emphasizes the importance of considering clonal background of *L. monocytogenes* isolates in surveillance, epidemiological investigation and disease control.

Découverte de l'hypervirulence de *Lm* par l'étude de sa biodiversité

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

Article: Maury MM, Tsai YH, Charlier C, Touchon M, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Criscuolo A, Gaultier C, Roussel S, Brisabois A, Disson O, Rocha EP, Brisse S, Lecuit M. 2016. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature Genetics.* 48(3):308-13.

Abstract: Microbial pathogenesis studies are typically performed with reference strains, thereby overlooking within-species heterogeneity in microbial virulence.

Here we integrated human epidemiological and clinical data with bacterial population genomics to harness the biodiversity of the model foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* and decipher the basis of its neural and placental tropisms.

Taking advantage of the clonal structure of this bacterial species, we identify clones epidemiologically associated either with food or with human central nervous system (CNS) or maternal-neonatal (MN) listeriosis. The latter clones are also most prevalent in patients without immunosuppressive comorbidities. Strikingly, CNS- and MN-associated clones are hypervirulent in a humanized mouse model of listeriosis. By integrating epidemiological data and comparative genomics, we have uncovered multiple new putative virulence factors and demonstrate experimentally the contribution of the first gene cluster mediating *L. monocytogenes* neural and placental tropisms.

This study illustrates the exceptional power in harnessing microbial biodiversity to identify clinically relevant microbial virulence attributes.

5.5. TAXONOMIE

Le CNRL participe à la révision du genre *Listeria* et à l'inclusion de nouvelles espèces en relation avec les données récentes issues d'approches de génomique.

Il a également caractérisé deux nouvelles espèces dans le cadre de coopération : *L. thailandensis* et *L. costaricensis*, en cours de publication.

Listeria thailandensis sp. nov. Isolated from food in Thailand

Poster A. Leclercq, A. Moura, N. Tessaud-Rita, H. Bracq-Dieye, P. Thouvenot, G. Vales, M. Maury, G. Aquilhon, M. Lecuit. 2016. *Listeria thailandensis* sp. nov. Isolated from food in Thailand. ISOPOL, Paris, 2016, Poster 63

Abstract: Typical *Listeria* spp. colonies were sampled from fried chicken products in Thailand using the PALCAM and ALOA™ (bioMérieux) media. Preliminary results on the identification of this isolate were not concordant at the species-level based on VITEK2, VITEK MS (bioMérieux), 16S rRNA gene sequencing and phenotypic traits using API-Listeria (no haemolysis and catalase positive), matching either *L. welshimeri*, *L. grayi* or *L. floridensis*. Further characterization was performed based on whole-genome sequencing. Phylogenetic analyses showed that this isolate represents a novel *Listeria* species. Whole-genome average nucleotide BLAST identity (ANIb) analyses placed the novel taxa as a member of the clade containing *L. aquatica* (86% ANIb) and *L. floridensis* (76% ANIb). Genome analysis identified the presence of virulence genes involved in adherence (*lap*), intracellular survival (*lplA1*, *oppA*, *prsA2*, *purQ*, *svpA*) and in the regulation of transcription and translation (*virRS*). However, pathogenicity islands LIPI-1 to LIPI-4, internalins *inlABCEFGHJK* genes, or genes coding bile resistance were not present, suggesting that this species is not pathogenic. The name *Listeria thailandensis* sp. nov. is proposed for this species, represented by the type strain CLIP 2015/00305^T.

5.6. PARTICIPATION A LA MAITRISE AGROALIMENTAIRE

Contrôle des biofilms de Listeria monocytogenes

Article : Pérez-Ibarreche M, Castellano P, Leclercq A, Vignolo G. 2016. Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. *FEMS Microbiol Lett.* 2016 Jun; 363(12). pii: fnw118. doi: 10.1093/femsle/fnw118.

The effect of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862 and its bacteriocin in the control of *Listeria* biofilm formation on industrial surfaces at 10°C was investigated. A screening among different *Listeria* species was performed allowing selecting *L. monocytogenes* FBUNT for its use as a biofilm producer on stainless steel (SS) and polytetrafluoroethylene (PTFE) surfaces. Three conditions were simulated to evaluate the ability of the bacteriocinogenic strain to displace, exclude and compete pathogen biofilm formation. *Lactobacillus sakei* CRL1862 effectively inhibited biofilm formation by *L. monocytogenes* FBUNT through the three assayed mechanisms, pathogen inhibition being more efficient on PTFE than on SS surface. Moreover, co-culture of *L. monocytogenes* FBUNT with the bacteriocin-producer displayed the highest efficacy reducing the pathogen by 5.54 ± 0.12 and 4.52 ± 0.01 on PTFE and SS, respectively. Industrially, the pre-treatment with *L. sakei* CRL1862 or its bacteriocin (exclusion) constitutes the most realistic way to prevent pathogen biofilm settlement. The use of bacteriocins and/or the bacteriocin-producer strain represents a safe and environmentally-friendly sanitation method to mitigate post-processing food contamination.

5.7. ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET TOLERANCE AUX BIOCIDES

Le CNR a évalué l'apport de la génomique pour le remplacement de son activité d'antibiogramme. Sur 23 antibiotiques investigués et selon les données d'antibiogrammes, seulement 3 peuvent être estimés en termes de résistance avec une approche de génomique.

Le CNR a intégré dans les outils de sa plateforme BIGSdb une recherche des gènes responsables du mécanisme de tolérance de *L. monocytogenes* au chlorure de benzalkonium.

Le CNR est en cours de rédaction d'une revue sur l'antibiorésistance des *L. monocytogenes* d'origine humaine en France de 2011 à 2016 venant compléter celle de Morvan *et al.* publiée en 2010 (16).

5.8. PUBLICATIONS NATIONALES

Leclercq A, Fravallo P., le CES BIORISK de l'ANSES. Fiche de danger : *Listeria monocytogenes*. Approuvée par l'Anses en Février 2017.

Tourdjman M, Donguy MP, Leclercq A, Fredriksen N, Remonnay J, Chenal-Francisque V *et al.* Épidémie d'infections à *Listeria monocytogenes* dans l'est de la France, 2014. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire ; 2016. 8 p. (<http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2016/Epidemie-d-infections-a-Listeria-monocytogenes-dans-l-est-de-la-France-2014>)

5.9. PUBLICATIONS INTERNATIONALES

Maury, M.M.*, Tsai, Y.H.* , Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., Criscuolo, A., Gaultier, C., Roussel, S., Brisabois, A., Disson, O., Rocha, E.P., Brisse, S., Lecuit, M. 2016 Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. Nat Genet. 48(3):308-13. doi: 10.1080/09273948.2016.1276788. * equal contribution

Michelon, D., Leclercq, A., Garric, G., Guillier, L., Beaufort, A., Bergis, H. 2016, Growth Potential Assessment of *Listeria* in Milk Fat Products by Challenge Testing. Journal of Food Safety. 36: 260–270.

Dreyer M, Aguilar-Bultet L, Rupp S, Guldemann C, Stephan R, Schock A, Otter A, Schüpbach G, Brisse S, Lecuit M, Frey J, Oevermann A. 2016. *Listeria monocytogenes* sequence type 1 is predominant in ruminant rhombencephalitis. Sci Rep. 6:36419.

Moura A, Criscuolo A, Pouseele H, Maury MM, Leclercq A, Tarr C, Björkman JT, Dallman T, Reimer A, Enouf V, Larssonneur E, Carleton H, Braccq-Dieye H, Katz LS, Jones L, Touchon M, Tourdjman M, Walker M, Stroika S, Cantinelli T, Chenal-Francisque V, Kucerova Z, Rocha EPC, Nadon C, Grant K, Nielsen EM, Pot B, Gerner-Smidt P, Lecuit M, Brisse S. 2016. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. Nat Microbiol. 2:16185.

Pérez-Ibarreche M, Castellano P, Leclercq A, Vignolo G. 2016. Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. FEMS Microbiol Lett. 2016 Jun; 363(12). pii: fnw118. doi: 10.1093/femsle/fnw118.

Danion F, Maury MM, Leclercq A, Moura A, Perronne V, Léotard S, Dary M, Tanguy B, Braccq-Dieye H, Thouvenot P, Lecuit M, Charlier C. *Listeria monocytogenes* isolation from urine: a series of 15 cases and review. Clin Microbiol and Infect 2017 sous presse. doi: 10.1016/j.cmi.2017.01.007

Chersich M, Takkinen J, Charlier C, Leclercq A, Adams P, Godbole G, Altmeyer U, Friesema I, Labbé Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter F, Luchters S, Lecuit M, Cimino L. Diagnosis and treatment of *Listeria monocytogenes* endophthalmitis: a systematic review. Ocular Immunology and Inflammation 2017. Sous presse. doi: 10.1080/09273948.2016.1276788

Charlier C, Perrodeau E, Leclercq A, Cazenave B, Pilmis B, Henry B, Lopes A, Maury M, Moura A, Goffinet F, Braccq Dieye H, Thouvenot P, Ungeheuer MN, Tourdjman M, Goulet V, de Valk H, Lortholary O, Ravaud P, Lecuit M. 2017. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. Lancet Infect Dis. 2017 in press. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30521-7.

Moura A*, Tourdjman M*, Leclercq A*, Hamelin E, Laurent E, Fredriksen N, Van Cauteren D, Braccq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Tessaud-Rita N, Maury MM, Alexandruu A, Criscuolo A, Quevillon E, Donguy MP, Enouf V, de Valk H, Brisse

S, Lecuit M. 2016. Impact of whole genome sequencing on *Listeria monocytogenes* microbiological and epidemiological surveillance: a two-year prospective study in France. *En cours de soumission*. * equal contribution

5.10. CHAPITRES DE LIVRES

Leclercq A, Charlier-Woerther C, Disson O, Jacquet C, Martin P, Rocourt J, Lecuit M. Chapitre *Listeria monocytogenes*. In: Précis de Bactériologie clinique, ESKA (ed), *Sous-Presses*.

Leclercq, A., Charlier-Woerther, C. Kayal, S. 2016. Chapitre *Listeria*. In. Traité EMC Biologie Médicale Elsevier (ed.), *Sous-Presses*.

5.11. COMMUNICATIONS NATIONALES

L'industrie agro-alimentaire face à la diversité des *Listeria* : Evolution taxonomique et situation épidémiologique. A. Leclercq. Présentation orale. 16ème colloque bioMérieux Actualités et perspectives en Microbiologie Alimentaire, Paris, France, (2016) Octobre 18

Genome-based epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. A. Moura. Présentation orale. Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Paris, France, (2016)

Surveillance génomique de *Listeria monocytogenes* en France en 2015. A. Moura. Présentation orale. 36^{ième} Réunion Interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI), Paris, France (2016) décembre 12-13

5.12. COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

Genome-based epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes* at a global scale. A. Moura. Poster ID98, ESCMID-SEGEM CONFERENCE, 11eme International Meeting in Microbial Epidemiological Markers, Estoril, Portugal, (2016) March 9-12

Perinatal Listeriosis: a prospective series from 82 neonates. Poster. C Charlier, A. Leclercq, E. Perrodeau, P. Ravaut, M. Lecuit. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, The Netherlands (2016) Avril 9-12

Genome-based epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes* at a global scale. Présentation Orale A. Moura. Moura A, Pouseele H, Criscuolo A, Maury M, Touchon M, Leclercq A, V Chenal-Francisque, H Dieye, T Cantinelli, L Jones, Larsson E, Tarr C, H Carleton, Kucerova Z, L S Katz, S Stroika, JT Larsson, A Reimer, M Walker, C Nadon, E M Nielsen, T Dallman, Grant K, Gerner-Smidt P, Pot B, Lecuit M, Brisse S. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, The Netherlands (2016) Avril 9-12

Identification of *Listeria monocytogenes* in the urine: retrospective analysis of 14 cases. Poster N°199. F. Danion, A. Leclercq, M. Maury, M. Lecuit et C. Charlier. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Food and Environmental investigations of sporadic invasive listeriosis cases – France, 2003-2015. Poster N°138. M. Tourdjman, A. Leclercq, E. Laurent, V. Goulet, N. Fredricksen, M.P. Donguy, H. De Valk, M. Lecuit. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Changes in epidemiology and surveillance of listeriosis in France. H. De Valk Présentation Orale. H. De Valk, M. Tourdjman, A. Leclercq, M. Maury, A. Moura, V. Chenal-Francisque, V. Goulet, S. brisse, M. Lecuit. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Hospital-acquired listeriosis outbreak linked to prolonged contamination of a hospital kitchen environment. Poster N°137. M. Tourdjman, A. Leclercq, C. Groleau, L. Soyer, A. Moura, E. Laurent, M.P. Dongy, G. Coan, D. Legoff, S. Brisse, M. Lecuit, H. De Valk. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Characterization of non-haemolytic *Listeria monocytogenes* isolates, impact on virulence. Poster N°179. H. Bracq-Dieye, V. Chenal-Francisque, M. Maury, L. Han, A. Leclercq, M. Scortti, O. Disson, E. Gouin, J.A. Vazquez-Boland, M. Lecuit. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Evaluation du MALDI-TOF mass spectrometry of identification of *Listeria* species. Poster N°64. P. Thouvenot, G. Vales, H. Bracq-Dieye, N. Tessaud-Rita, A. Moura, M. Maury, M. Lecuit, A. Leclercq. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Genome-based surveillance of *L. monocytogenes* in France in 2015. Poster N°58. A. Moura, A. Leclercq, H. Bracq-Dieye, P. Thouvenot, G. Vales, M. Maury, H. De Valk, A. Criscuolo, V. Enouf, S. Brisse, M. Lecuit. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

A multiplex PCR to identify hypervirulent and hypovirulent clones of *Listeria monocytogenes*. Poster N°62. V. Chenal-Francisque, M. Maury, M. Lavina, M. Touchon, A. Leclercq, M. Lecuit, S. Brisse. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Listeria thailandensis sp. nov. Poster N°63. A. Leclercq, A. Moura, N. Tessaud-Rita, H. Bracq-Dieye, P. Thouvenot, G. Vales, M. Maury, G. Aquilhon, M. Lecuit. Isolated from food in Thailand. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. Poster N°132. A. Moura, A. Criscuolo, H. Pouseele, M. Maury, A. Leclercq, C. Tarr, Jonas T. Björkman, T. Dallman, A. Reimer, V. Enouf, E. Larssonneur, H. Carleton, H. Bracq-Dieye, L. S. Katz, L. Jones, M. Touchon, M. Tourdjman, M. Walker, S. Stroika, T. Cantinelli, V. Chenal-Francisque, Z. Kucerova, E. P. C. Rocha, C. Nadon, K. Grant, E. M. Nielsen, B. Pot, P. Gerner-Smidt, M. Lecuit, S. Brisse. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Isolation of *Listeria monocytogenes* from urine: analysis of 14 cases. Poster N°199. F. Danion, A. Leclercq, M. Maury, M. Lecuit, C. Charlier. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Highly prevalent *Listeria monocytogenes* sequence types in neurolisteriosis. Poster N°60. M. Dreyer, L. Aguilar-Bultet, A. Thomann, S. Rupp, M. Ganter, C. Guldemann, M. Lecuit, S. Brisse, R. Stephan, A. Schock, A. Otter, J. Frey, A. Oevermann. International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Standardization and quality-assurance in PCR based methods in the microbiology of the food chain. A. Leclercq, Présentation orale, 4th qPCR and Digital PCR Congress, London, UL, (2016) Octobre 20-21

5.13. CONFERENCES SUR INVITATIONS

Listériose 2017. C. Charlier, Présentation orale, Journées de Microbiologie Clinique. Paris (2017) Janv 12

Les souches hypervirulentes de *Listeria monocytogenes*. M. Maury, Présentation orale, Topo de fond du CES BIORISK, Anses, Maisons-Alfort, France, (2016) Mars 15

New insights in the pathogenesis of *Listeria*, M. Lecuit, Présentation orale, 38th annual infectious diseases symposium, Lucerne, Switzerland (2016) Mars 31

CNR et LNR au temps du NGS : enjeux et perspective pour la référence et la santé publique : Exemple de *Listeria*. S. Brisse, Présentation orale, Séminaire Commun LNR-CNR, Anses, Maisons-Alfort, (2016) Mars 31

Maldi-Tof MS : Utilisateur (MS Bruker)/Accréditation : Exemple *L. monocytogenes*. A. Leclercq, Présentation orale, Journée « Spectrométrie de masse pour l'identification des agents pathogènes pour les animaux et/ou zoonotiques » de la Commission Afnor U47A Santé Animale, Afnor, La Plaine-Stade de France, (2016) Avril 5

Listeria invasion of host tissues, M. Lecuit, Présentation orale, 25th Pasteur-Weizmann meeting, Rehovot, Israel (2016) Apr 13-14

Bacterial population biology and applications to global epidemiology and public health: examples of *Klebsiella pneumoniae* and *Listeria monocytogenes*. S. Brisse, Présentation orale, Séminaire du Département de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris, France, (2016) avril 22

Listériose et grossesse. 13 min de Médecine. C. Charlier, Présentation orale, Conférence du centre de recherche translationnelle, Institut Pasteur, (2016) Mai

New insights in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*, M. Lecuit, Présentation orale, Seminar of the Center of Excellence in Bacteriology of the University of Geneva, Geneva (2016) Mai 2

Clinical, microbiological and pathophysiological insights on neurolisteriosis, M. Lecuit, Présentation orale, Richard T Johnson lecture, 10th Liverpool Neurological Infectious Diseases Course, University of Liverpool, Liverpool (2016) Mai 5-6

Revisiting *Listeria monocytogenes* virulence. M. Lecuit, Présentation orale, International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Clinical features and pronostic factors of listeriosis: the MONALISA study. C. Charlier, Présentation orale, International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Jun 14-17

Utilisation, Normalisation, Management de la qualité en génomique et méthodes associées pour la microbiologie de la chaîne alimentaire. A. Leclercq, Présentation orale, Journée « Techniques NGS pour l'identification des agents pathogènes pour les animaux et/ou zoonotiques » de la Commission Afnor U47A Santé Animale, Afnor, Paris, (2016) Octobre 10

New insights in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. M. Lecuit, Présentation orale, Hokkaido University, 19th leading seminar, Sapporo, Japan (2016) Oct 26

Listeria infections: what does MONALISA teach us? M. Lecuit, Présentation orale, 59^{ième} Journée de l'Hôpital Claude Bernard. Université Paris Diderot, Paris, France (2016) Nov 17

Actualités sur la caractérisation et le typage de *Listeria monocytogenes*. A. Moura et M. Maury, présentation orale, Réunion des réseaux de laboratoires officiels, Anses (LNR *Listeria monocytogenes*), Maisons-Alfort, France, (2016) Novembre 24

Listeria invasion of host tissues: mechanisms and effects. M. Lecuit, Présentation orale, 50th Annual meeting of the French Society for Immunology, Paris, France (2016) Nov 28-30

Impact of the microbiota on neonatal susceptibility to bacterial meningitis. M. Lecuit, Présentation orale, International Symposium Microbes and Brain. Institut Pasteur, Paris, France (2016) Dec 7

Utilisation, Normalisation, Management de la qualité en génomique et méthodes associées pour la microbiologie de la chaîne alimentaire. A. Leclercq, Présentation orale, Les apports du NGS à la bactériologie et à la métagénomique, Illumina, Paris, France, (2016) Décembre 8

Listeria invasion of host tissues: mechanisms and effects. M. Lecuit, Présentation orale, Berlin Life Science Colloquium. Max-Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany (2016) Dec 13

5.14. MEMBRES DE COMITE D'ORGANISATION OU MODERATEUR DE CONGRES

C. Charlier, M. Lecuit, membres du comité d'organisation de la RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), Paris, France (2016) Décembre. C. Charlier modératrice de 4 sessions à la RICAI (2016)

M. Lecuit, membre du comité scientifique, International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Juin 14-17

A Leclercq, modérateur de la session « Food Safety », International Symposium on Problems of Listeriosis, XIXth Isopol, Paris, France (2016) Juin 14-17

5.15. PRESENCE DANS LES MEDIAS

Les publications de M. Maury *et al.*, A. Moura *et al.* ainsi que C. Charlier *et al.* ont fait l'objet de communiqués de presse repris dans la presse nationale et internationale:

<https://www.pasteur.fr/fr/espace-presse/documents-presse/listeriose-meilleure-comprehension-meilleure-prise-charge-infection>

<https://www.pasteur.fr/fr/journal-recherche/actualites/comment-etude-biologie-populations-listeria-ouvre-ere-nouvelle-surveillance-listeriose>

<https://www.pasteur.fr/fr/listeria-souches-hypervirulentes-tropisme-cerebral-placentaire>

Un article Hanne-Lys Meyer (Interview A. Leclercq). La population à risque vis-à-vis de *Listeria* change. Revue Laitière Française, 767 :36-37. (2016) Décembre.

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

6.1. COOPERATION

- Coopération entre le CNR et le LNR sur l'étude des populations de *L. monocytogenes*, concrétisée par la publication de Mylène Maury avec comme co-auteurs du LNRI A. Brisabois et S. Roussel: [Maury, M.M.*](#), [Tsai, Y.H.*](#), [Charlier, C.](#), [Touchon, M.](#), [Chenal-Francisque, V.](#), [Leclercq, A.](#), [Criscuolo, A.](#), [Gaultier, C.](#), [Roussel, S.](#), [Brisabois, A.](#), [Disson, O.](#), [Rocha, E.P.](#), [Brisse, S.](#), [Lecuit, M.](#) 2016 Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature Genetics* 48(3):308-13. doi: 10.1080/09273948.2016.1276788.

- Coopération CNR/LNR sur l'impact des nouvelles espèces sur les méthodes de référence de détection de *Lm* concrétisée par la publication de L. Barre : Barre, L., Angelidis, A. S., Boussaid, D., Brasseur, E. D., Manso, E., Gnanou Besse, N. 2016. Applicability of the EN ISO 11290-1 standard method for *Listeria monocytogenes* detection in presence of new *Listeria* species. *Int J Food Microbiol.* 238 : 281-287.

- Le LNRI a invité le CNRL a participé aux évènements suivants :

- CNR et LNR au temps du NGS : enjeux et perspective pour la référence et la santé publique : Exemple de *Listeria*. S. Brisse, Présentation orale, Séminaire Commun LNR-CNR, Anses, Maisons-Alfort, (2016) Mars 31
- Actualités sur la caractérisation et le typage de *Listeria monocytogenes*. A. Moura et M. Maury, présentation orale, Réunion des réseaux de laboratoires officiels, Anses (LNRI), Maisons-Alfort, France, (2016) Nov 24

- Le CNRL et le LNRI ont été en appuis techniques et conseils de la DGAI sur une expertise de deux méthodes commerciales d'isolement de *Lm* dans les aliments validées Afnor Certification selon la norme NF EN ISO 16140-2.

- le CNRL participe au CES BIORISK de l'ANSES (A. Leclercq, membre du CES), au groupe de travail ANSES « Attribution des Sources des dangers » et a révisé la fiche de danger *Listeria monocytogenes* pour le CES BioRisk de l'ANSES : [Leclercq A.](#), [Fravalo P.](#), [Barre L.](#) (approuvée par l'Anses en Février 2017).

6.2. ECHANGES ENTRE LE CNR ET LE LNR

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. Le CNRL et le LNRI dont les bases de typage moléculaire sont compatibles peuvent échanger rapidement des données de typage moléculaire dans des investigations de cas groupés.

Le CNRL échange hebdomadairement avec le LNRI ces données de surveillance dans le cadre de la surveillance nationale et lui procure trimestriellement les souches d'alertes produits.

Le CNRL échange avec l'EURLLm et le LNRI sur l'antibiorésistance des souches de *L. monocytogenes* (S. Granier).

6.3. PERSPECTIVES

Le CNRL participe et a été auditionné par le groupe de travail ANSES sur l'attribution des sources de pathogènes.

7. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES 2017-2018

Outre la poursuite des activités de surveillance et d'expertise, le programme de travail plus spécifique du CNRL pour les années 2017-2018 est le suivant :

Activités d'expertise :

- Continuité des activités mises en place ;
- Adaptation de l'activité en fonction des instructions de la cellule *Listeria* ;
- Développement d'une procédure d'urgence avec SPF afin de détecter le plus précocement possible tout épisode de cas groupés.

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

- Optimisation (ajustement possible du cut-off des cas groupés) et référencement comme méthode de référence de la méthode de comparaison des souches de *L. monocytogenes* basée sur l'étude du core génome MLST (cgMLST) ;
- Evaluation de la dynamique des clones au sein des souches réceptionnées dans le cadre de la surveillance ;
- Suivi et analyse de la prévalence relative des clones MLST de *Lm* (« sequence type ») au cours du temps.

Surveillance microbiologique :

- Détection de la résistance aux antibiotiques et de la tolérance aux antiseptiques, et détermination des mécanismes de résistance et de tolérance ;
- Compréhension de la saisonnalité des cas de listériose (cf. p 12) ;
- Analyse des souches atypiques de *Listeria* (souches de *Lm* non hémolytiques, *L. innocua* hémolytique possédant l'ilot de pathogénicité majeur de *Lm*).

Étude du lien entre exposition alimentaire / colonisation / infection :

- Détermination de la fréquence et de la nature des souches du portage de *Lm*, décrit dans 1 à 5% de la population générale selon des études anciennes. Aucune étude précise à ce sujet n'a été entreprise. Ces données sont clés pour comprendre l'écologie de *Lm*, décrire l'histoire naturelle de l'infection humaine, identifier de nouveaux facteurs bactériens et de l'hôte favorisant le portage et/ou l'infection invasive ;
- Étude de la distribution des clones MLST et cgMLST dans les différents types d'aliments et la confronter aux données d'exposition alimentaires des patients atteints de listériose (étude MONALISA). Ceci permettra, en tenant compte des différences de potentiel pathogène de ces clones, d'identifier les aliments les plus à risque d'être à l'origine de cas de listériose. Grâce aux résultats obtenus, de nouvelles recommandations sur la consommation alimentaire pourront être faites ;
- A la demande de la DGAI, suivi des clusters de souches alimentaires pour en comprendre les liens comme les matières premières communes, etc.

Aspects diagnostiques :

- 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 *Lm*, et mise en évidence des caractéristiques génotypiques et phénotypiques différenciant les souches cliniques des souches environnementales notamment alimentaires.

Aspects thérapeutiques :

- Evaluation et synthèse de l'antibiorésistance des *Lm*;
- Evaluation d'alternatives thérapeutiques si présentes dans le traitement de la neurolistériose.

Aspects cliniques :

- Analyse et revue des données clinico-biologiques relatives aux souches d'origine humaine reçues au CNRL ;
- Étude des formes cliniques en fonction du terrain (diabète, cancer, âge élevé, dans le cadre de MONALISA).

Aspects préventifs:

- Etablissement des recommandations ciblées pour les différentes populations à risque.

Etude médico-économique :

- Réalisation d'une étude médico-économique de la surveillance de la listériose en France, qui permette de mettre en regard le coût de la surveillance et l'économie réalisée par la prévention des cas.

Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux :

- Participation aux groupes de travail *Listeria* du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire de l'ECDC ;
- Contribution avec SPF au reporting des données françaises pour la base ECDC TESSY, et à l'investigation de cas groupés ou d'épidémies européennes signalées sur la base ECDC EPIS ou Infosan (WHO) ;
- Participation à l'exercice européen EFSA-ECDC et au projet ELITE ainsi qu'aux projets et mandats en découlant.

8. REFERENCES

1. Maury MM, Tsai YH, Charlier C, Touchon M, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Criscuolo A, Gaultier C, Roussel S, Brisabois A, Disson O, Rocha EP, Brisse S, Lecuit M. 2016. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet* 48:308-13.
2. Charlier C, Perrodeau E, Leclercq A, Cazenave B, Pilmis B, Henry B, Lopes A, Maury MM, Moura A, Goffinet F, Dieye HB, Thouvenot P, Ungeheuer MN, Tourdjman M, Goulet V, de Valk H, Lortholary O, Ravaud P, Lecuit M, group Ms. 2017. Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* doi:10.1016/S1473-3099(16)30521-7.
3. Farfour E, Leto J, Barritault M, Barberis C, Meyer J, Dauphin B, Le Guern AS, Lefleche A, Badell E, Guiso N, Leclercq A, Le Monnier A, Lecuit M, Rodriguez-Nava V, Bergeron E, Raymond J, Vimont S, Bille E, Carbonnelle E, Guet-Revillet H, Lecuyer H, Beretti JL, Vay C, Berche P, Ferroni A, Nassif X, Join-Lambert O. 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.
4. Moura A, Criscuolo A, Pouseele H, Maury MM, Leclercq A, Tarr C, Bjorkman JT, Dallman T, Reimer A, Enouf V, Larsonneur E, Carleton H, Bracq-Dieye H, Katz LS, Jones L, Touchon M, Tourdjman M, Walker M, Stroika S, Cantinelli T, Chenal-Francisque V, Kucerova Z, Rocha EP, Nadon C, Grant K, Nielsen EM, Pot B, Gerner-Smidt P, Lecuit M, Brisse S. 2016. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat Microbiol* 2:16185.
5. Anonyme. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA, Parme, Italie Accessible à <http://ecdceuropaeu/en/publications/Publications/zoonoses-trends-sources-EU-summary-report-2014pdf>.
6. Mook P, O'Brien SJ, Gillespie IA. 2011. Concurrent conditions and human listeriosis, England, 1999-2009. *Emerg Infect Dis* 17:38-43.
7. Pouillot R, Hoelzer K, Jackson KA, Henao OL, Silk BJ. 2012. Relative risk of listeriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites according to age, pregnancy, and ethnicity. *Clin Infect Dis* 54 Suppl 5:S405-10.
8. Charlier C, Leclercq A, Cazenave B, Desplaces N, Travier L, Cantinelli T, Lortholary O, Goulet V, Le Monnier A, Lecuit M. 2013. *Listeria monocytogenes*-associated joint and bone infections: a study of 43 consecutive cases. *Clin Infect Dis* 54:240-8.
9. Charlier C, Fevre C, Travier L, Cazenave B, Bracq-Dieye H, Podevin J, Assomany D, Guilbert L, Bossard C, Carpentier F, Cales V, Leclercq A, Lecuit M. 2014. *Listeria monocytogenes*-associated biliary tract infections: a study of 12 consecutive cases and review. *Medicine (Baltimore)* 93:e105.
10. Danion F, Maury MM, Leclercq A, Moura A, Perronne V, Leotard S, Dary M, Tanguy B, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Lecuit M, Charlier C. 2017. *Listeria monocytogenes* isolation from urine: a series of 15 cases and review. *Clin Microbiol Infect* doi:10.1016/j.cmi.2017.01.007.
11. Chersich MF, Takkinen J, Charlier C, Leclercq A, Adams PE, Godbole G, Altmeyer U, Friesema IH, Labbe Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter F, Luchters SM, Lecuit M, Cimino L. 2017. Diagnosis and Treatment of *Listeria monocytogenes* Endophthalmitis: A Systematic Review. *Ocul Immunol Inflamm* doi:10.1080/09273948.2016.1276788:1-10.
12. Goulet V, Hebert M, Hedberg C, Laurent E, Vaillant V, De Valk H, Desenclos JC. 2012. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin Infect Dis* 54:652-60.
13. Hof H, Nichterlein T, Kretschmar M. 1997. Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 10:345-57.
14. Leclercq A, Chenal-Francisque V, Dieye H, Cantinelli T, Drali R, Brisse S, Lecuit M. 2011. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. *Int J Food Microbiol* 147:74-7.
15. Chenal-Francisque V, Maury MM, Lavina M, Touchon M, Leclercq A, Lecuit M, Brisse S. 2015. Clonogrouping, a Rapid Multiplex PCR Method for Identification of Major Clones of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 53:3355-8.
16. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Herve-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, Courvalin P, Le Monnier A. 2010. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2728-31.
17. Chenal-Francisque V, Charlier C, Mehvish S, Dieye H, Leclercq A, Courvalin P, Lecuit M. Highly Rifampin-Resistant *Listeria monocytogenes* Isolated from a Patient with Prosthetic Bone Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1829-30.

18. Isnard C, Fines-Guyon M, Toublet FX, Guerin F, Rogowski C, Vergnaud M, Cattoir V. 2016. In vivo emergence of rifampicin resistance by *rpoB* mutation in *Listeria monocytogenes* during therapy of prosthetic joint infection. *Int J Antimicrob Agents* 48:572-574.
19. Khen BK, Lynch OA, Carroll J, McDowell DA, Duffy G. 2014. Occurrence, Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* in the Beef Chain in the Republic of Ireland. *Zoonoses Public Health* doi:10.1111/zph.12106.
20. Hof H. 2013. Chemotherapy of *Listeria* infections. *GMS Infectious diseases* 1:1-10.
21. Charlier-Woerther C, Leclercq A, Lortholary O, Lecuit M. 2009. [Listeriosis, a rare but severe foodborne infection]. *Rev Prat* 59:905-11.
22. 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.
23. Angelidis AS, Kalamaki MS, Georgiadou SS. 2015. Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a beta-D-glucosidase-positive phenotype on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA). *Int J Food Microbiol* 193:114-29.
24. Muller A, Rychli K, Muhterem-Uyar M, Zaiser A, Stessl B, Guinane CM, Cotter PD, Wagner M, Schmitz-Esser S. Tn6188 - a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS One* 8:e76835.
25. Cotter PD, Draper LA, Lawton EM, Daly KM, Groeger DS, Casey PG, Ross RP, Hill C. 2008. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 4:e1000144.
26. Disson O, Grayo S, Huillet E, Nikitas G, Langa-Vives F, Dussurget O, Ragon M, Le Monnier A, Babinet C, Cossart P, Lecuit M. 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* 455:1114-8.
27. Jacquet C, Doumith M, Gordon JI, Martin PM, Cossart P, Lecuit M. 2004. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis* 189:2094-100.
28. Lecuit M, Nelson DM, Smith SD, Khun H, Huerre M, Vacher-Lavenu MC, Gordon JI, Cossart P. 2004. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6152-7.
29. Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, Babinet C, Cossart P. 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722-5.
30. FAO, OMS. 2002. Exemple de la cellule "Listeria", abstr Conférence paneuropéenne sur la sécurité sanitaire et la qualité des aliments, document de séance de la délégation française, Budapest, Hongrie,
31. Roussel S., Leclercq A, Santolini A, Agbessi A, Chenal-Francisque, V. L, R. L, M., , Pihier N, Brisabois A. 2012. Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments. . *Bull Epidemiol Bebdom Hors série*. 9 mai 2012:41-45.
32. 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.
33. Leclercq A, Le Monnier A. 2015. *Listeria monocytogenes*, p 527-532. In *Microbiologie SFd (ed), Référentiel en microbiologie médicale (REMIC)*, vol 5.2, Paris, France.
34. 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.
35. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. 2013. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis* 13:11.
36. Michelon D, Leclercq A, Garric G, Guillier L, Beaufort A, Bergis H. 2016. Growth potential assessment of *Listeria* in milk fat products by challenge testing. *Journal of Food Safety* 36:260-270.
37. de Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, Havelaar A, Speybroeck N. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 14:1073-82.
38. Leclercq A, Charlier C, Lecuit M. Global burden of listeriosis: the tip of the iceberg. *Lancet Infect Dis* 14:1027-8.
39. Lazarus C, Leclercq A, Lecuit M, Vaillant V, Coignard B, Blanchard H, Novakova I, Astagneau P. 2013. Probable nosocomial transmission of listeriosis in neonates. *J Hosp Infect* 85:159-60.

40. Tourdjman M, Leclercq A, Groleau C, Soyer L, Moura A, Laurent E, Donguy MP, Conan G, Legoff D, Brisse S, Lecuit M, De Valk H. Hospital-Acquired listeriosis outbreak linked to prolonged contamination of a hospital kitchen environment - France, 2013, p. In (ed),
41. Moura A, Criscuolo A, Pouseele A, Maury MM, Leclercq A, Tarr C, Björkman JT, Dallman T, Reimer A, Enouf V, Larssonneur E, Carleton H, Bracq-Dieye H, Katz LS, Jones L, Touchon M, Tourdjman M, Walker M, Stroika S, Cantinelli T, Chenal-Francisque V, Kucerova Z, Rocha EPC, Nadon C, Grant K, Nielsen EM, Pot B, Gerner-Smidt P, Lecuit M, Brisse S. 2016. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nature Microbiology*:in press.
42. Richard S, Oggioni C, Jacquet C, Laurent E, Lequerrec F, Quelquejeu N, Goulet V. 2004. Investigations autour de cas de listériose neuroméningée: bilan de 1è mois de fonctionnement. *Bull Epidemiol Hebdom* 9:35-36.
43. 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 Hebdom Hors Série*. 9 mai 2012.:38-40.
44. Tourdjman M, Laurent E, Leclercq A. 2014. Listériose humaine : une zoonose d'origine alimentaire. *Revue Francophone des Laboratoires* 464:37-44.
45. Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L, Salmaso S. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med* 342:1236-41.
46. Dalton CB, Austin CC, Sobel J, Hayes PS, Bibb WF, Graves LM, Swaminathan B, Proctor ME, Griffin PM. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med* 336:100-5.
47. Ooi ST, Lorber B. 2005. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis* 40:1327-32.
48. Gilchrist M. 2009. Cutaneous *Listeria* infection. *Br J Hosp Med (Lond)* 70:659.
49. Ivanek R, Grohn YT, Tauer LW, Wiedmann M. 2004. The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:513-23.
50. Goulet V, Leclercq A, Vaillant V, Le Monnier A, Laurent E, Thierry-Bled F, Pihier N, De Valk H. 2008. Recrudescence récente des cas de listériose en France. *Bull Epidemiol Hebdom* 30-31:268-272.
51. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42:3819-22.
52. Graves LM, Swaminathan B. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 65:55-62.
53. Halpin JL, Garrett NM, Ribot EM, Graves LM, Cooper KL. Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog Dis* 7:293-8.
54. Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, Brisse S. 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog* 4:e1000146.
55. Haase JK, Didelot X, Lecuit M, Korkeala H, Achtman M. 2013. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study. *Environ Microbiol* 16:405-16.
56. Haase JK, Murphy RA, Choudhury KR, Achtman M. Revival of Seeliger's historical 'Special *Listeria* Culture Collection'. *Environ Microbiol* 13:3163-71.
57. Chenal-Francisque V, Lopez J, Cantinelli T, Caro V, Tran C, Leclercq A, Lecuit M, Brisse S. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis* 17:1110-2.
58. Anonyme. 2012. *European Manual of Clinical microbiology*, 1st ed. SFM & ESCMID, Paris, France.
59. Gholizadeh Y, Poyart C, Juvin M, Beretti JL, Croize J, Berche P, Gaillard JL. 1996. Serodiagnosis of listeriosis based upon detection of antibodies against recombinant truncated forms of listeriolysin O. *J Clin Microbiol* 34:1391-5.
60. De Lappe N, Lee C, O'Connor J, Cormican M. 2014. Misidentification of *Listeria monocytogenes* by the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol* 52:3494-5.

ANNEXE A : 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. Les caractéristiques principales de la listériose sont :

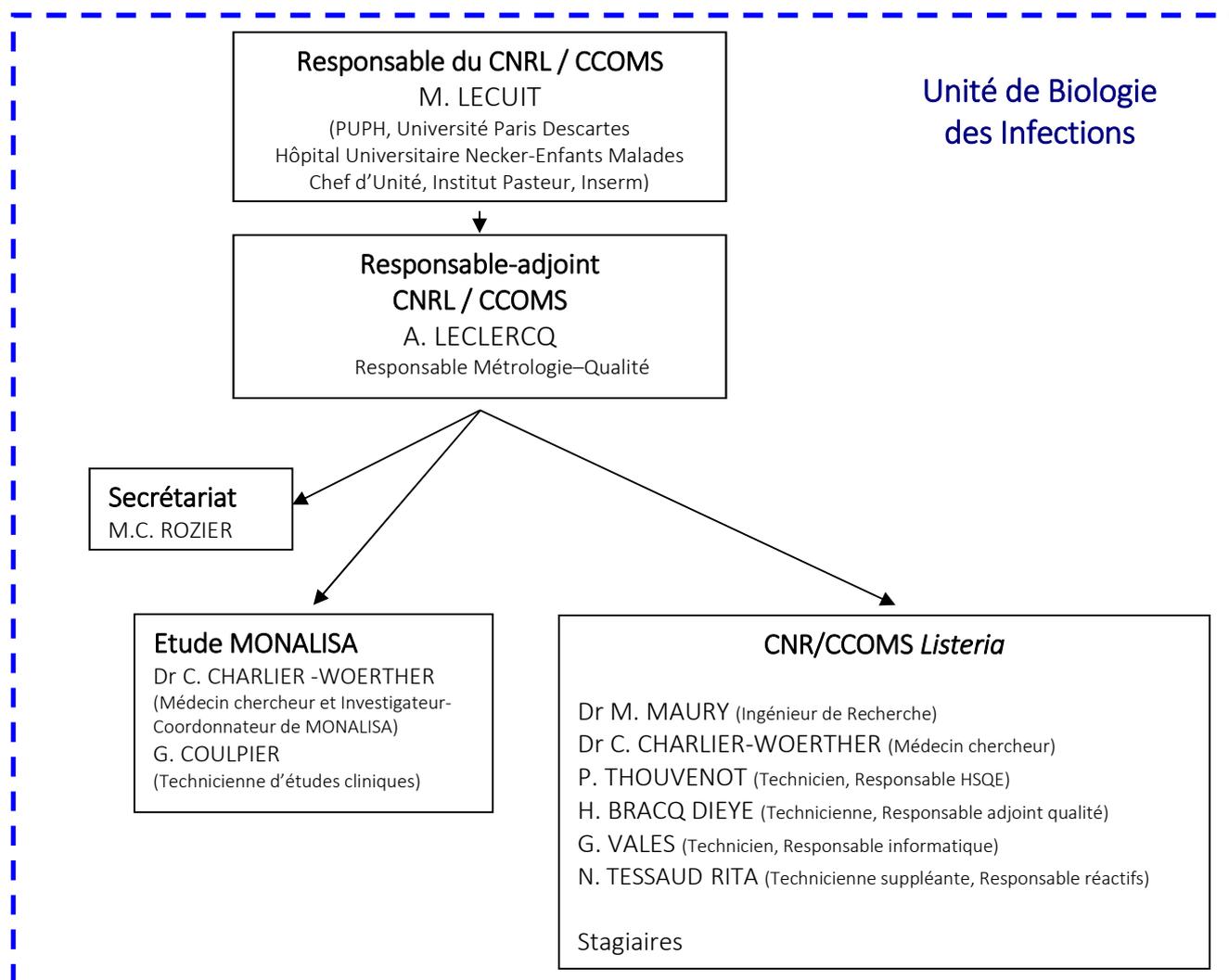
- l'existence d'une **population à risque** : les femmes enceintes et leurs nouveau-nés, les personnes âgées et les sujets dont l'immunité innée et/ou cellulaire est diminuée (immunosuppresseurs, corticothérapie, chimiothérapie, cancer, diabète, alcoolisme, etc.).
- une **présentation clinique sous différentes 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 (45-47). 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). Ces trois présentations représentent plus de 90% des formes invasives. D'autres manifestations, rares, sont parfois observées, telles que les formes cutanées isolées (48), ostéo-articulaires (8), péritonéales, ganglionnaires, biliaires (9), urinaire (10).
- une **transmission par voie alimentaire** (>99 % des cas). La femme enceinte peut transmettre l'infection au fœtus *in utero* par voie trans-placentaire, ou, très exceptionnellement, durant l'accouchement. La transmission directe par voie cutanée, exceptionnelle, a été observée 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 30 à 40% (2) et les formes neuroméningées représentent la quatrième cause de méningo-encéphalite en France. Elles requièrent quasi systématiquement une hospitalisation (93%), souvent prolongée et en soins intensifs (5). Les infections MN se compliquent de perte fœtale dans 25% des cas, mais sont en règle générale sans gravité pour la mère.
- le **coût de l'infection** par patient est élevé (49).
- 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 2012 (43, 50). Elle est évaluée depuis 2016 à environ 5.6 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 100 épidémies ont été rapportées dans la littérature à ce jour dont 14 en France (Tableau 7). Celles-ci ont diminué en magnitude et en fréquence avec la mise en place des différents éléments du système de surveillance en France.
- la listériose n'est que **rarement rapportée dans les pays du Sud** (37, 38). 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 (moindre diffusion d'aliments d'origine industrielle potentiellement contaminés, moindre utilisation et conservation de produits réfrigérés), qui peuvent conduire à une moindre exposition de la population.

ANNEXE B : ORGANISATION DU CNR

B.1. PERSONNEL PERMANENT

Organigramme

Figure 21. Organigramme du CNR des *Listeria*



Les effectifs

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

Les personnels du CNRL possèdent collectivement une expertise médicale clinique et en microbiologie clinique, une expertise en microbiologie et sécurité sanitaire des aliments, une expertise en microbiologie fondamentale et génomique.

Les techniciens sont déclarés à l'ARS Ile-de-France dans le cadre de leur activité au CNRL. La secrétaire travaille à mi-temps pour le CNRL, participe à l'investigation de cas atypiques de listérioses (recherche dans les archives de

cas similaires, au suivi des correspondances avec les laboratoires pour recueillir les données clinico-biologiques) et assure l'enregistrement des métadonnées.

Tableau 9. Personnel affecté au CNR des *Listeria*

Nom – Prénom	Libellé Emploi	ETP*
LECUIT Marc	Médecin, Chercheur, Responsable	0,2**
LECLERCQ Alexandre	Ingénieur de recherche confirmé, Responsable-Adjoint	0,7
MAURY Mylène	Ingénieur de recherche confirmé	0,3
CHARLIER-WOERTHER Caroline	Médecin, Chercheur	0,2**
THOUVENOT Pierre	Technicienne supérieure de laboratoire	0,9
VALES Guillaume	Technicien supérieur de laboratoire	0,8
BRACQ DIEYE Hélène	Technicienne supérieure de laboratoire	0,9
ROZIER Marie-Christine	Secrétaire	0,5
TOTAL Equivalent Temps Plein (ETP)		4,5

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

** Personnel non financé par SPF.

B.2. LOCAUX

Laboratoires et bureaux :

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

Les pièces décrites sur la Figure 22 hébergent le CNRL et le Centre collaborateur de l'OMS des *Listeria* (CCOMS).

Locaux du CNRL (Figure 22) :

1 pièce laboratoire dédiée (A) et accès à un laboratoire de recherche et de réception des colis (A')

1 pièce de PCR partagée (B)

1 pièce d'incubation partagée (C)

1 pièce de pesée partagée

1 chambre froide partagée

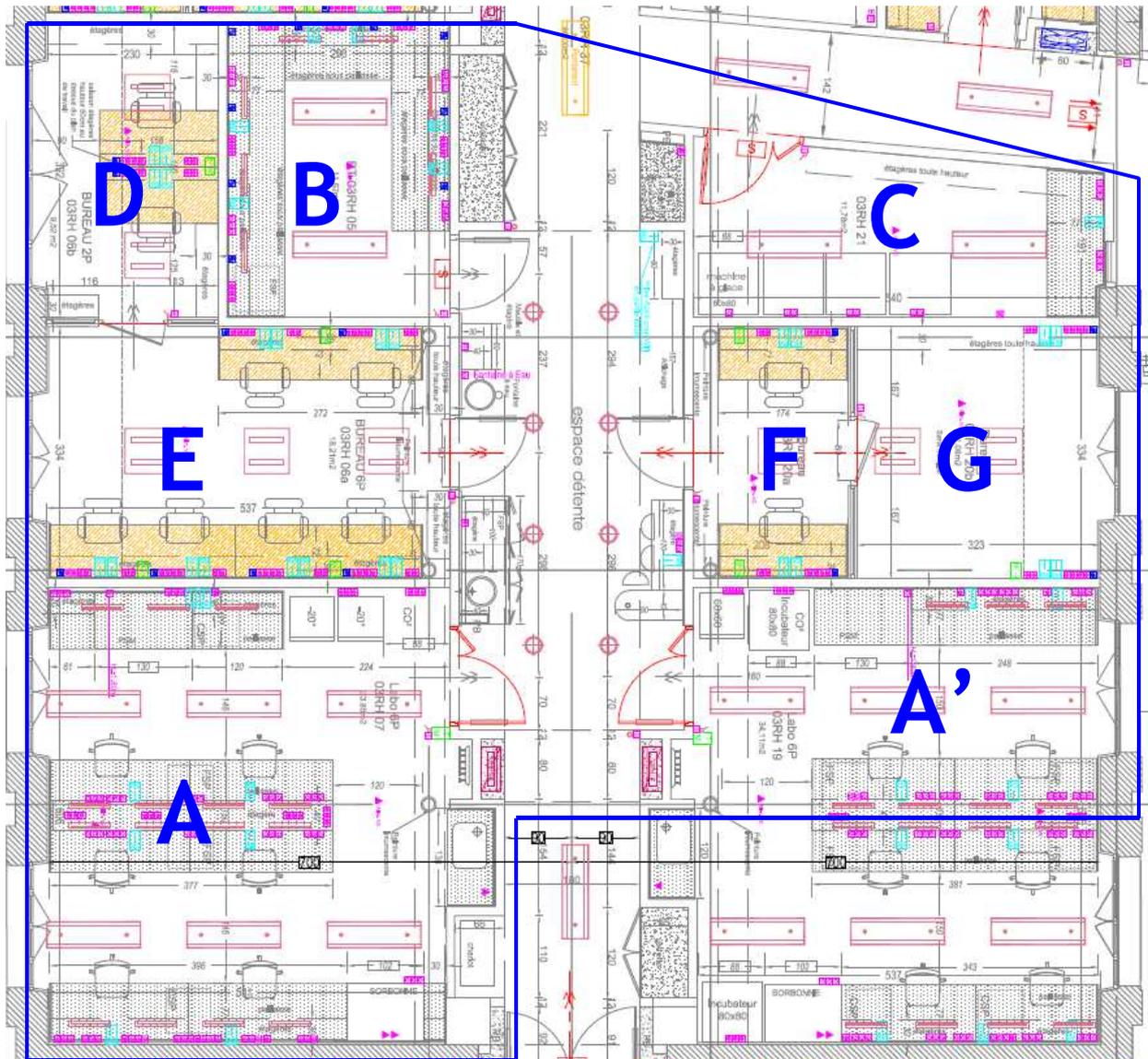
3 pièces de bureaux dédiées (D, E, F)

1 bibliothèque /salle de réunion /Archives partagées (G)

1 laverie / salle des autoclaves / salle de préparation partagées avec d'autres CNR et Unités.

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

Figure 22. Plan des locaux du CNR des *Listeria*. Les Lettres bleues sont définies ci-dessus.



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. En 2016, l'Institut Pasteur a financé l'acquisition d'équipements de qualité « biologie biomédicale » dans le cadre de l'accréditation du CNRL et du respect des réglementations, et a également investi pour l'automatisation de la lecture des antibiogrammes.

Matériel, équipements utilisés

- Matériel courant d'un laboratoire règlementaire de confinement L2 de microbiologie classique et de biologie moléculaire,
- 1 poste de sécurité microbiologique PSM II,
- 2 étuves,
- 3 bains thermostatés humides et 1 bain thermostaté à sec,
- 5 réfrigérateurs,
- 2 congélateurs,
- 1 congélateur -80°C,
- 2 centrifugeuses dont une pour les plaques,
- 1 lecteur automatique d'antibiogrammes Intersciences intégrant les référentiels CA-SFM, EUCAST et CLSI,
- 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 conformes à la réglementation sur les données de santé.

Equipements partagés

- 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 conforme à la réglementation sur les données de santé,
- 1 thermocycleur temps réel partagé avec d'autres CNRs.

Equipement informatique

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

Moyens extérieurs à la structure / Structures transversales

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

B.4. PLAN DE CONTINUITE

Une organisation minimale du CNRL permettant d'assurer la continuité de ses activités en période de crise sanitaire exceptionnelle a été conçue. Elle permettrait au CNRL de conserver une autonomie de fonctionnement humain, matériel et de la maintenance de la collection.

B.5. MANAGEMENT DE LA QUALITE ET HYGIENE/SECURITE AU SEIN DU CNRL

Le CNRL est accrédité depuis 2015 par le COFRAC selon la norme EN ISO 15189 (Attestation d'accréditation N°8-2588 disponible sur le site web du COFRAC) et fait partie du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LRE-MS) de l'Institut Pasteur). Cette accréditation lui permet de répondre à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale. Son système de management de la qualité repose sur plus de 530 documents dématérialisés et rassemblés dans la base de gestion documentaire de l'Institut

Pasteur (Webcampus). Ces documents sont revus annuellement et appliqués par l'ensemble du CNRL. Ce système est conforme aux normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 17025. Le correspondant qualité est A. Leclercq.

Liste des faits marquants survenus de 2014 à 2016 :

1. Evaluation COFRAC LRE-MS dont CNR *Listeria* (Méthode Groupage PCR) : Juin 2015
2. Obtention de l'accréditation en Octobre 2015
3. Audit interne technique : Décembre 2015
4. Audit interne qualité : Janvier 2016
5. Revue qualité LRE-MS du CNR *Listeria* : 30 Mars 2016
6. Revue de direction LRE-MS : 23 Mai 2016
7. Notification par le COFRAC du renouvellement de l'accréditation du LREMS : Mai 2016
8. Audit interne technique : Décembre 2016
9. Audit interne qualité : Décembre 2016
10. Evaluation de surveillance COFRAC LRE-MS en Janvier 2016 : 1 jour d'évaluation pour le CNRL en qualité/technique. Les conclusions de l'audit de surveillance de Janvier 2017 ont été positives, le rapport d'évaluation indique que les évaluateurs accordent leur confiance au LRE-MS
11. Revue qualité LRE-MS du CNR *Listeria* : Mars 2017
12. Revue de direction du LRE-MS : Mai 2017
13. Audits internes technique et qualité : Septembre-octobre 2017
14. Demande d'extension de la portée d'accréditation (Méthode Maldi-Tof MS) : 2017
15. Audit de surveillance et/ou d'extension du LRE-MS : Fin 2017-début 2018
16. Demande d'extension de la portée d'accréditation (Méthode Antibiogramme) : 2018

Le Génosérotypage a été sélectionné en 2014 pour l'accréditation, car c'est un outil qui permet d'assurer une traçabilité entre les ADN envoyés à la plateforme de séquençage PIBnet/P2M et la séquence.

Le CNRL a participé en 2016 au groupe de travail du COFRAC sur l'accréditation des méthodes WGS de la section Laboratoires.

Le calendrier des futures demandes d'accréditation de méthodes est présenté dans le tableau 10.

Tableau 10. 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>Lm</i> par Maldi-Tof MS	100%	2017
Génosérotypage de <i>Listeria monocytogenes</i>	100%	2015
Détermination de la sensibilité de <i>Lm</i> aux agents antimicrobiens (Méthode EUCAST)	20%	2018

Essais d'intercomparaison (EQA) de l'ECDC

En 2016, le CNRL a réalisé un essai d'intercomparaison avec le CNR Belge des *Listeria* du Dr S. Bertrand, Institut Scientifique de Santé Publique Bruxelles. Le but est de vérifier que les CNRs génèrent des résultats similaires à partir d'un même échantillon, condition essentielle pour que des échanges de données puissent avoir lieu. Pour les EQA depuis 2013, le CNRL a obtenu les résultats présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11. Résultats du CNRL à l'EQA de l'EURL puis de l'ECDC de 2012 à 2016

Campagne EQA (Date)	EURL <i>Lm</i> (Avril 2012)	EQA N°1 ECDC (Mars 2013)	EQA N°2 ECDC (Octobre 2013)	EQA N°3 ECDC (Octobre 2014)	EQA N°4 ECDC (Octobre 2015)	EQA N°5 ISP (Décembre 2016)
Nombre de laboratoires participants	33	18	18	18	18	2
Nombre de souches testées	10	10	10	11	11	15
Identification <i>Lm</i> par phénotypie	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Identification <i>Lm</i> par Maldi-Tof MS	ND	ND	ND	ND	ND	Conforme
Scores sérotypage classique	ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND
Scores sérotypage moléculaire	ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Qualité Gel PFGE	<i>Ascl</i>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
	<i>Apal</i>					
Analyse gel PFGE Bionumerics	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND

Enquête satisfaction client

En 2016, le CNRL a envoyé une enquête de satisfaction clients à 550 laboratoires (78% de LABM et 22% de laboratoires de Microbiologie Alimentaire) avec un taux de réponse de 21%. Les questions posées et les notes obtenues sont listées dans le tableau 12. D'après les réponses obtenues, 34% des laboratoires font appel au CNRL pour son support technique et ses conseils, 36% pour la qualité du service et pour 49% d'entre eux, il s'agit d'un choix imposé. Les principaux axes d'amélioration suggérés sont : un délai de rendu de résultats plus court et des résultats disponibles par voie dématérialisée via internet. Lors de cette enquête, le CNRL utilisait encore l'ancienne version de son site internet. La prochaine enquête satisfaction client aura lieu fin 2018.

Mode dégradé

Dans le cadre de son accréditation, le CNRL a mis en place un système permettant d'effectuer des analyses en urgence et en mode dégradé, ce qui passe parfois par de la sous-traitance, avec accord des autorités compétentes.

Hygiène/Sécurité

Le correspondant hygiène et sécurité identifié au CNRL au sein de l'Institut Pasteur est P. Thouvenot.

Tableau 12. Résultats de l'enquête satisfaction client 2016

Questions Posées	Note moyenne sur 4 en 2016 (en 2014)
1. Activités analytiques	
1.1 - Méthodes réalisées	3.6 (3.4)
1.2 – Conditions générales analytiques sur notre site Web	3.4 (3.2)
1.3 - Contenu du compte-rendu d'analyses	3.4 (3.5)
1.4 - Délai de rendu de résultats	3.0 (3.0)
2. Relations	
2.1 - Accueil téléphonique	3.3 (3.4)
2.2 - Disponibilité des interlocuteurs	3.3 (3.4)
2.3 - Qualité des réponses données	3.5 (3.5)
2.4 - Traitement de vos réclamations	3.3 (3.4)
3. Site Web	
3.1 - Présentation	3.2 (3.3)
3.2 - Intérêt des informations données	3.3 (3.3)
3.3 - Convivialité du site web	3.2 (3.1)
4. Compte-rendu diffusé	
4.1 - Respect des délais de rendu des résultats	3.1 (3.1)
4.2 – Présentation et clarté du compte rendu	3.3 (3.4)
4.3 – Les moyens de transmission des résultats	3.1 (3.0)
4.4. – Interprétations des résultats et commentaires oraux des responsables du CNR	3.4 (3.4)
4.5 – Conformité des analyses réalisées avec votre demande	3.4 (3.5)
5. La présentation générale	
5.1. – Etes-vous satisfait de la prestation de conseil assurée par les Responsables ?	3.4 (3.5)

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

C.1. Méthodes de références et marqueurs épidémiologiques disponibles

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

Les souches font systématiquement l'objet des analyses suivantes :

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

- **Identification du genre et de l'espèce** par spectrométrie de masse Maldi-Tof (Bruker Daltonics, Allemagne) et recherche du caractère hémolytique, complétés par d'autres tests classiques si nécessaire (33). Les tests biochimiques [galerie API-*Listeria*® (bioMérieux, France)] ne sont utilisés qu'exceptionnellement, en cas de panne du spectromètre de masse ou de résultats ambigus ou de détermination de la sous-espèce, ainsi que pour comparaison avec les résultats de laboratoires correspondants. Les souches atypiques ou identifiées comme non *Listeria* spp. sont identifiées par analyse du gène codant pour la sous-unité ribosomale 16S ou du gène *iap* après amplification par PCR, puis par séquençage du génome. La technique de spectrométrie de masse Maldi-Tof a été validée par l'analyse de plus de 517 souches identifiées préalablement par la méthode traditionnelle biochimique et séquençage génomique.

- **Détermination du sérotype PCR** (Méthode accréditée ISO 15189) selon la méthode publiée par le CNRL en 2004 (51) et amendée en 2011 (14). Cette PCR multiplex cible une partie de la séquence du gène *prs* présent dans l'ensemble des espèces décrites de *Listeria* et quatre autres gènes (*Lmo1118*, *Lmo0737*, *ORF2110*, *ORF2819*) spécifiques de *Lm*, permettant de déterminer le sérotype PCR. Cette PCR multiplex peut être effectuée directement sur colonie sur gélose de la souche envoyée par le correspondant. Le sérotype PCR est également identifié *in silico* à partir de la séquence génomique. La comparaison du sérotype PCR déterminé *in silico* avec celui déterminé *in vitro* est utilisée comme contrôle interne pour confirmer la concordance entre la séquence génomique et l'isolat correspondant. Le CNR possède l'ensemble des sérums antifacteurs O et H commerciaux et de référence OMS pour réaliser sur demande (majoritairement hors-France) le sérotypage classique des souches de *Listeria* spp.

- **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. La lecture de l'antibiogramme est réalisée sur un automate paramétré pour le référentiel EUCAST. Les éventuelles résistances sont confirmées par la détermination de la CMI par E-test. Les mécanismes des résistances identifiées sont ensuite étudiés (16, 17).

- **Séquençage du génome**. Les ADNs génomiques sont extraits (méthode DNeasy Blood & Tissue extraction kit (Qiagen, Danemark)) et vérifiés en qualité par fluorimétrie. La préparation des bibliothèques est réalisée en utilisant le kit NEXTERA XT DNA Sample et les séquences génomiques sont déterminées sur la plateforme Illumina NextSeq 500 (Illumina, Californie, USA). L'assemblage est réalisé avec le logiciel CLC Assembly Cell 4.3.0 (Qiagen, Danemark). Le cgMLST est extrait du génome assemblé par l'algorithme BLASTN implémenté sur la plateforme BIGSdb-*Lm* (<http://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>) puis transféré dans le logiciel bioNumerics version 6.6. pour réaliser les comparaisons et analyses. Cette méthode cgMLST sera utilisée à partir du 1^{er} janvier 2017 en routine pour la surveillance, en remplacement de la PFGE. L'analyse des génomes permet également la

caractérisation de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques et antiseptiques. Ainsi la détection de mutations conduisant à la troncation dans le facteur de virulence InIA permet d'estimer le niveau de virulence de la souche concernée. En cas d'épidémie, de crise ou d'urgence, le CNRL peut augmenter son recours au séquençage grâce à l'utilisation d'autres équipements de l'Institut Pasteur.

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

- **Analyse des profils de macrorestriction d'ADN génomique** (électrophorèse en champ pulsé ou PFGE) dans le cadre d'investigations internationales. Ces profils sont 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 décrits par Graves et coll. en 2001 et modifié en 2013 (52, 53). Un dictionnaire de correspondance entre les profils PFGE et typage MLST a été développé par le CNRL (1, 54). Cet outil permet l'identification du clone MLST de chaque souche analysée par PFGE.

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

- **Typage MLST par PCR multiplexe**. L'appartenance à un clone MLST peut être déterminée rapidement par une méthode de PCR multiplexe (PCR de clonogrouping) développée et brevetée par le CNRL (15). Cette méthode permet de positionner rapidement les souches par rapport aux clones MLST majeurs et d'ainsi prédire le potentiel infectieux des souches (1).

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

- A la demande de l'ANSM, le CNRL réalise également des **analyses de détection de souches de *Lm* viables** par isolement sur gélose ALOA (bioMérieux) à partir d'échantillons de selles.

Le CNRL ne réalise pas :

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

- de PCR ou qPCR sur LCR ou d'autres échantillons cliniques à visée diagnostic, qui sont effectuées en LABM.

C.2. MAINTIEN, DETENTION ET DIFFUSION DE MATERIEL BIOLOGIQUE

Les différentes collections de souches bactériennes

Il existe 8 catégories de souches envoyées au CNRL :

1. **souches humaines** : souches ayant été à l'origine de cas cliniques.
2. **Alerte sanitaire** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de production de ces aliments, isolées dans le cadre d'investigation de cas groupés ou d'épidémies et lors d'enquêtes ponctuelles autour d'un cas, à la demande de l'InVS, de la DGS, de la DGAL ou de la DGCCRF.
3. **alerte produit** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de production de ces aliments, isolées dans le cadre de contrôles officiels ou autocontrôles faisant l'objet d'une alerte DGAL avec saisie, retrait, ou rappel de produit. Ces « alertes-produits » correspondent soit à des « non-conformités » aux critères réglementaires fixés pour les aliments (présence de *Lm* ou dépassement du seuil de 100 *Lm/g-ml*), soit à des situations considérées par la DGAL comme des menaces pour la santé publique.
4. **plans de surveillance/contrôle et contrôles officiels** placés sous la responsabilité de la DGAL et de la DGCCRF/DGDDI. Pour cette catégorie, dès lors que l'on se trouve en situation d'alerte telle que décrite au point 3 ci-dessus, la souche passe de la catégorie 4 à la catégorie 3.

5. **autocontrôles** : Les souches provenant de « clients » particuliers (industriels dans le cadre d'autocontrôles, laboratoires vétérinaires départementaux (LVD), laboratoires privés d'hygiène et de contrôle, etc).
6. **santé animale** : souches transmises par les LVD dans le cadre de la surveillance de la santé animale.
7. **études et projets de recherche** : souches isolées lors d'enquêtes, d'études sur un type de produit ou une filière particulière, ou dans le cadre de projets de recherches.
8. **environnement** : souches environnementales (eau, aliments pour animaux, sol, boues de station d'épuration, etc.)

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

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

En 2016, le CNRL n'a pas reçu de demandes de distribution de souches ou de sérums mais a communiqué 887 souches d'alertes produits au LNRL. Le CNRL échange maintenant les séquences génomiques qu'ils possèdent comme lors des investigations d'épidémies comme décrit précédemment.

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. rocourtiae*, *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. Le CNR actualise sa collection avec les nouvelles espèces ou souches atypiques. Toutes ces souches sont conservées en géloses profondes dans des pièces à température contrôlée, et à -80°C en tubes de cryo-billes dans un congélateur sous alarme.

Collection de Listeria de l'Institut Pasteur (CLIP)

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

Cette collection, majoritairement française, mais également internationale (CCOMS) comportait 107684 souches à la fin de l'année 2016. Ces souches sont d'origine clinique, alimentaire et environnementale, ainsi que vétérinaire ou de recherche. **Il s'agit d'une collection unique, de par son caractère prospectif et exhaustif**, qui centralise les souches humaines et alimentaires du système de surveillance français. Environ 66.500 souches de cette collection proviennent du CNRL. Elles sont conservées en géloses profondes 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* d'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 *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* (55, 56). Ces souches ont été caractérisées phénotypiquement et sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée.

Collection ILSI North America

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

-80°C en tube de cryobilles dans un congélateur sous alarme.

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

Il s'agit d'une collection sous management de la qualité (certifiée AFAQ NF 96 900) où le CNRL a déposé depuis 2004 sous contrat 152 souches qui constituent un échantillon représentatif des souches françaises humaines et non humaines du genre *Listeria* isolées de 1981 à nos jours (souches d'épidémies, de travaux de séquençage, de sérovars rares, de référence, types, etc.) ainsi que les souches de référence de taxonomie et de sérotypie. Des souches du genre *Listeria* et de l'espèce *monocytogenes* ayant des propriétés originales sont régulièrement mises en collection. La liste de ces souches est consultable à l'adresse web : 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

Le CNRL produisait les 13 sérums dirigés 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 (51), la production en routine de ces sérums a été arrêtée, mais un stock minimum a été maintenu pour la détermination des sérotypes rares, comme le sérotype 7. Le CNRL détient également l'ensemble des sérums Denka Seiken (Japon) commerciaux de sérotypage des principaux sérotypes de *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 diagnostics fondés sur l'utilisation des phages, leur utilisation potentielle en thérapeutique et en sécurité microbiologique des denrées alimentaires telle que le phage P100 ayant obtenu l'autorisation GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA aux USA.

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. Ces accords peuvent inclure des dispositions financières et ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire, de cadrer leur utilisation et la propriété des résultats. Pendant la durée de son mandat, l'unité de recherche reconnue CNR, de par 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 le cas échéant détruire le matériel biologique à la fin du programme de recherche et au plus tard à la date de fin du mandat du CNR.

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 garantie 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.

À l'issue du mandat du CNR, si celui-ci n'est pas renouvelé, l'Institut Pasteur remettra au nouveau CNR identifié, l'intégralité des échantillons collectés au cours du mandat conformément au Décret n°2016-806 du 16 juin 2016.

Dossiers règlementaires

Le CNRL ne possède pas de collections d'échantillons humains et n'utilise pas d'organismes génétiquement modifiés, alors que l'Unité de Biologie des Infections également dirigée par Marc Lecuit et au sein de laquelle il est hébergé détient ces autorisations. Le genre *Listeria* ne contenant pas de MOT listés à l'article L5139-1 du Code de la Santé Publique, le CNRL n'est pas soumis à cette réglementation.

C.3. MAINTIEN ET DETENTION DES BASES DE DONNEES

La base de données de séquences

Base de spectres de masses de souches de *Listeria* : le CNRL a constitué depuis 2015 une base de données de plus de 1000 spectres de masse de *Listeria* obtenus par spectrométrie de masse Maldi-Tof sur équipement Bruker. Cette base de données est gérée sous les logiciels MBT Compass Explorer (Bruker) et bionumerics version 7.6. par les techniciens du CNRL.

Base de données MLST : Après la publication d'une méthode de typage de *Lm* par multilocus sequence typing (MLST) (54, 57), le CNRL, en collaboration avec Sylvain Brisse (Unité de Génomique Evolutive des Microbes, Institut Pasteur), a mis en place une base de données MLST hébergée par l'infrastructure informatique de l'Institut Pasteur. La base contient l'ensemble des allèles des gènes MLST et des profils alléliques définis avec cette méthode. Une partie de la base est dédiée à la collecte des informations sur les souches représentatives de chaque profil MSLT présent dans la base. Cette base est ouverte et accessible en ligne à la communauté scientifique (<http://bigsdbs.pasteur.fr/listeria/listeria.html>). M. Maury (CNRL) et S. Brisse sont curateurs de cette base. Ce système partagé favorise les échanges et les collaborations internationales sur l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria*.

Base de données cgMLST : la base de données, ainsi que les outils nécessaires pour caractériser des souches par cgMLST (selon la méthode mise au point au CNRL) à partir de séquences génomiques, ont été mis à disposition de la communauté scientifique (<http://bigsdbs.pasteur.fr/listeria/listeria.html>). A la fin de l'année 2016, cette base de données contenait 15.000 génomes publics ou privés de *Listeria*.

Les conditions de mise à disposition

L'accès aux données des bases relève des mêmes conditions que celles indiquées dans le chapitre précédent.

Pour la base de séquences génomiques, une consultation publique ou privée est possible. Une police définit le cadre des dépôts et des consultations pour la partie privée. Sauf réquisition écrite auprès du CNRL par les autorités compétentes ou avec l'accord écrit du tiers privé ou de l'organisme étranger concerné, les données privées ne sont pas communicables aux autorités.

C.4. TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNRL

En microbiologie clinique

Le CNRL recommande de suivre les recommandations de l'European Manual of Clinical Microbiology / REMIC européen, 5ème édition, 2015, chapitre *Listeria* (58).

Dans le cas de la réception d'un prélèvement en vue de la réalisation d'une PCR sur échantillons biologiques ou de sérologie, le CNRL transfère la demande au service accrédité COFRAC de Microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants malades pour les demandes de PCR sur LCR et aux laboratoires spécialisés (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 directement sur gélose ALOA™ ou géloses équivalentes si selles de moins de 24h sinon isolement après congélation -20°C durant 2 semaines si selles de plus de 24h

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

- *Identification*

L'identification par MALDI-TOF est correcte pour les principales espèces isolées en France pour le système MALDI-TOF MS Bruker Daltonics et est correcte pour le genre pour le MALDI-TOF MS Vitek MS (bioMérieux).

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 (Oxoïd) 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*.

- *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, triméthoprim-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 v7.0 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 13 suivant d'interprétation des résultats d'antibiogrammes.

Tableau 13. Valeurs de référence pour l'interprétation des antibiogrammes pour *Listeria monocytogenes* (* selon le CLSI M45A2 et ** selon l'EU-CAST version 7.0 page 74 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
Chloramphénicol*	≤ 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 65) ne sont pas pris en compte dans la surveillance nationale (58) et ne sont 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 (59). 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 *Lm* disponibles. Il semble néanmoins pour les PCR sur LCR qu'une qPCR spécifique *Lm* (gène *hly*) soit plus sensible qu'une PCR 16S ADNr (Données préliminaires du projet Monalisa). Ainsi, les résultats de la PCR ne sont pas pris en compte à ce jour dans la surveillance nationale. La cellule interministérielle *Listeria* a missionnée le CNR en 2017 pour questionner les LABM français sur les kits ou méthodes utilisées pour le diagnostic de *Lm* sur LCR ou autres fluides biologiques afin de reconnaître ces dernières méthodes pour la définition des cas. On peut citer comme méthode de détection qualitative par qPCR de l'ADN de *Lm* en échantillons cliniques pouvant être effectuée dans des laboratoires spécialisés : kit RealCycler LIST-U/LIST-G (Orgentec SASU, Trappes).

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 16140-2 par AFNOR certification et par Microval 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) (60) et comme alternative la galerie MICROBACT 12L (Oxoid), il recommande à ses laboratoires correspondants ou interlocuteurs de se conformer aux recommandations émanant du Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* situé à l'ANSES-LSA (Maisons-Alfort). Le système MALDI-TOF MS Bruker Daltonics peut être également utilisé avec une extraction totale des protéines pour une identification des principales espèces de *Listeria* isolées en France.

Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNRL a transféré en 2016 sa méthode de typage cgMLST à d'autres laboratoires pour l'instant étrangers souhaitant utiliser cette technique.

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.

Base de spectres de masses de souches de *Listeria* : le CNRL a constitué depuis 2016 une base de données de plus de 1000 spectres de masse de *Listeria* obtenus par spectrométrie de masse Maldi-Tof sur équipement Bruker. Cette base de données est gérée sous les logiciels MBT Compass Explorer (Bruker) et bionumerics version 7.6. par les techniciens du CNRL.

Base de données MLST : Après la publication d'une méthode de typage de *Lm* par multilocus sequence typing (MLST) (54, 57), le CNRL, en collaboration avec Sylvain Brisse (Unité de Génomique Evolutive des Microbes, Institut Pasteur), a mis en place une base de données MLST hébergée par l'infrastructure informatique de l'Institut Pasteur. La base contient l'ensemble des allèles des gènes MLST et des profils alléliques définis avec cette méthode. Une partie de la base est dédiée à la collecte des informations sur les souches représentatives de chaque profil MLST présent dans la base. Cette base est ouverte et accessible en ligne à la communauté scientifique (<http://bigsdbs.pasteur.fr/listeria/listeria.html>). M. Maury (CNRL) et S. Brisse sont curateurs de cette base. Ce système partagé favorise les échanges et les collaborations internationales sur l'étude de la structure génétique des populations de *Listeria*.

Base de données cgMLST : la base de données, ainsi que les outils nécessaires pour caractériser des souches par cgMLST (selon la méthode mise au point au CNRL) à partir de séquences génomiques, ont été mis à la disposition de la communauté scientifique (<http://bigsdbs.pasteur.fr/listeria/listeria.html>). A la fin de l'année 2016, cette base de données contenait 15000 génomes publics ou privés de *Listeria*.

Pour la base de séquences génomiques, une consultation publique ou privée est possible. Une police définit le cadre des dépôts et des consultations pour la partie privée. Sauf réquisition écrite auprès du CNRL par les autorités compétentes ou avec l'accord écrit du tiers privé ou de l'organisme étranger concerné, les données privées ne sont pas communicables aux autorités.

Base de données et outil de comparaison PFGE/cgMST : 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 17.718 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 2015-2016, chaque souche possédait outre son profil PFGE, son profil cgMLST. Ainsi la surveillance génomique est réalisée maintenant par le logiciel Bionumerics au moyen d'automatisme accélérant la rapidité et la résolution de la surveillance nationale.

En Avril 2017, le CNRL passera à la version 7.5. qui incorporera un module automatique de définition des cgMLST que le CNRL, l'Institut Pasteur et Applied Maths ont développé ensemble afin de le mettre à disposition des autres laboratoires.

Management de la qualité :

Afin de réaliser le management de la qualité au CNRL, différents logiciels sont utilisés :

- un logiciel de management de la qualité KALILAB (gestion des travaux non conformes, réclamations, audits, dérogations, stocks de réactifs),
- un logiciel de gestion documentaire WEBCAMPUS,
- un logiciel de surveillance des températures critiques, THERMOCLIENT.