



Rapport d'activités

(Version simplifiée du dossier de candidature)

Marc LECUIT
Alexandre LECLERCQ

Septembre 2016

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 and M. Lecuit. 2016. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des *Listeria* – Années 2011-2015. 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 entre 2011 et 2015 des souches et des informations associées dans le cadre de la surveillance microbiologique de la listériose en France.

Les données présentées dans ce rapport couvrent les années 2011 à 2015.

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

Abréviatiion / 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
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 chaine
PFGE	Electrophorèse en champs pulsé
S	Septicémie
SPF	Santé Publique France
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TESSy	European Surveillance System

Table des matières

1. NOTE DE PRESENTATION	7
1.1. Note de présentation.....	7
2. DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE.....	9
2.1. Proposition d'organisation pour répondre au cahier des charges	9
2.1.1. Organisation des CNR à l'Institut Pasteur	9
2.2. Moyens du laboratoire candidat.....	11
2.2.1. Ressources humaines	11
2.2.2. Locaux	13
2.2.3. Equipements	14
2.2.4. Plan de continuité d'activité.....	15
2.3. Descriptif des thématiques de recherche du laboratoire candidat.....	15
2.4. Capacités techniques du laboratoire candidat	16
2.4.1. Méthodes et marqueurs épidémiologiques disponibles	16
2.4.2. Maintien, détention et diffusion de matériel biologique.....	18
2.4.3. Maintien et détention des bases de données	20
3. BILAN 2011-2015 DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES.....	22
3.1. Les activités au titre de l'expertise microbiologique.....	22
3.1.1. Contributions aux études épidémiologiques	22
3.1.2. Méthodes de diagnostic et caractérisation de souches atypiques	27
3.1.3. Analyses cliniques.....	29
3.1.4. Etude de la virulence	32
3.1.5. Taxonomie.....	37
3.1.6. Développement de nouveaux outils de diagnostic.....	37
3.1.7. Développement de nouveaux outils de typage moléculaire et étude de la diversité des <i>Listeria</i>	38
3.1.8. Etude de la résistance aux antibiotiques	42
3.2. Le conseil aux professionnels ou aux autorités compétentes.....	43
3.2.1. Centre de documentation et publication avec les laboratoires correspondants	43
3.2.2. Site Internet.....	43
3.2.3. Veille Internet.....	43
3.2.4. Enseignements, Formations, Accueil de stagiaires	43
3.2.5. Participation à la rédaction de communications écrites didactiques	44
3.2.6. Activité de conseil	44
3.2.7. Expertises	44
3.2.8. Retour d'informations	45
3.3. Contribution à la surveillance épidémiologique	46
3.3.1. Données de la surveillance microbiologique de la listériose humaine	46
3.3.2. Caractérisation des souches d'origine non humaine.....	69
3.4. Contribution à l'alerte.....	76
3.4.1. Suspensions d'infections nosocomiales.....	76

3.4.2.	Demande des ARS et CIRE	76
3.4.3.	Dépassements de seuils	77
3.4.4.	Toxi-infections Alimentaires Collectives et Epidémies.....	79
3.4.5.	Alertes-produits DGAI et investigations alimentaires	79
3.4.6.	Alertes-produits DGCCRF.....	80
3.4.7.	Alerte européenne et internationale.....	80
3.4.8.	Enquête sur les formes neuroméningées	81
3.4.9.	Expertises judiciaires	82
3.5.	Changement majeur de la surveillance et de l’alerte : utilisation de la génomique	82
4.	LISTE DES PUBLICATIONS	84
4.1.	Publications nationales	84
4.2.	Publications internationales.....	85
4.3.	Communications nationales.....	87
4.4.	Communications internationales	89
4.5.	Conférences sur invitations.....	92
4.6.	Chapitres de livres	94
4.7.	Interactions avec la presse.....	94
4.8.	Contributions ou collaborations avec des instances nationales et internationales	95
4.8.1.	Santé Publique France	95
4.8.2.	ANSES et LNR des <i>Listeria monocytogenes</i>	95
4.8.3.	ANSM	95
4.8.4.	DGS, DGAI et DGCCRF.....	96
4.8.5.	Laboratoire Communautaire de Référence (EURL) des <i>Listeria monocytogenes</i> et DG SANTE	96
4.8.6.	European Center for Diseases Control: ECDC.....	97
4.8.7.	Autorité Européenne de sécurité des Aliments: EFSA	97
4.8.8.	Center for Disease Control and PulseNet	97
4.8.9.	Agence de la Santé Publique du Canada	98
4.8.10.	Organisation Internationale de Normalisation (ISO) et Comité Européen de Normalisation (CEN).....	98
4.8.11.	Office International des Epizooties (OIE)	98
4.8.12.	EC Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF).....	98
4.8.13.	Centre Collaborateur OMS (CCOMS)	98
5.	DESCRIPTION DE L’INFRASTRUCTURE QUALITE	99
6.	DESCRIPTION DE L’INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE.....	104
6.1.	Système Informatique de Laboratoire.....	104
6.2.	Gestion des données	104
6.2.1.	Gestion des données clinico-biologiques : Logiciel LAGON (EpiConcept)	104
6.2.2.	Gestion des données de caractérisation/typage des souches	107
6.2.3.	Management de la qualité	107
6.2.4.	Grands axes de développement	107

6.3. Procédures visant au respect de la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractère personnel.....	108
6.4. Site internet Pages web CNR.....	109
7. REFERENCES	110
ANNEXE B	113
ANNEXE C	120

1. NOTE DE PRESENTATION

1.1. Note de présentation

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, ...)
- 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 [1-3]. 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 [4], ostéo-articulaires [5], péritonéales, ganglionnaires, biliaires [6] ou vasculaires ;
- 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 20 à 30% 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 [7]. 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 [8].
- 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 [9, 10]. Elle est évaluée depuis 2013 à environ 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 1). 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** [11, 12]. 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.

Tableau 1. Tableau récapitulatif des épidémies françaises de 1992 à 2015

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

- La surveillance de la listériose en France est détaillée en annexe C. Elle repose sur une déclaration des cas à l'Agence régionale de Santé rendue obligatoire depuis 1998, et à l'envoi volontaire des souches au CNR des *Listeria*, également Centre Collaborateur OMS. L'exhaustivité de ce système de déclaration est élevée, estimée >90% [9].

La surveillance microbiologique clinique et alimentaire des souches permet l'identification et le retrait des aliments ayant causé une infection et/ou la contamination dépasse un seuil réglementaire. Ce système de surveillance implique médecins, microbiologistes et épidémiologistes et les services concernés des ministères de la Santé (DGS), de l'Agriculture (DGAI), et des Finances (DGCCRF).
- Le CNRL reçoit dans le cadre de la surveillance des souches cliniques humaines depuis 1992, qu'il caractérise et dont il effectue le typage moléculaire. La caractérisation moléculaire des souches de *Lm* reposait depuis 1990 sur la méthode PFGE avec les enzymes *Ascl* et *Apal* [13]. **Depuis Janvier 2015, une nouvelle méthode de typage appelée cgMLST reposant sur le séquençage du génome et l'analyse du core génome bactérien a été développée et utilisée en parallèle à la PFGE [14].** La comparaison des deux méthodes de typage sur une année a permis de démontrer les avantages du cgMLST : meilleure discrimination des souches, permettant l'identification de clusters de plus petite taille, tout en évitant la mise en évidence de faux cas groupés qui étaient auparavant détectés par la PFGE. L'analyse par cgMLST permet également de caractériser les liens phylogénétiques entre les souches, à la différence de la technique PFGE, et d'ainsi analyser la biodiversité et l'évolution de *Lm*. Elle permet aussi la détection de gènes de virulence. La méthode PFGE sera abandonnée au profit de cette nouvelle méthode le 1er Janvier 2017.
- Le CNRL conduit depuis 2009 une étude prospective nationale avec SPF pour mieux caractériser les formes cliniques de la listériose et identifier des facteurs de risque et pronostiques. Il s'agit de l'étude cas-témoins **MONALISA** (clinical trials NCT01520597) dont les premiers résultats sont en cours de publication (plus de 1000 patients inclus à ce jour).

2. DESCRIPTIF DES CAPACITES DU LABORATOIRE

2.1. Proposition d'organisation pour répondre au cahier des charges

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

Le CNRL est également en contact constant avec plus de 600 biologistes français, ainsi que l'ensemble des laboratoires vétérinaires départementaux, la DGCCRF et les laboratoires privés d'hygiène des aliments (environ 210 correspondants).

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

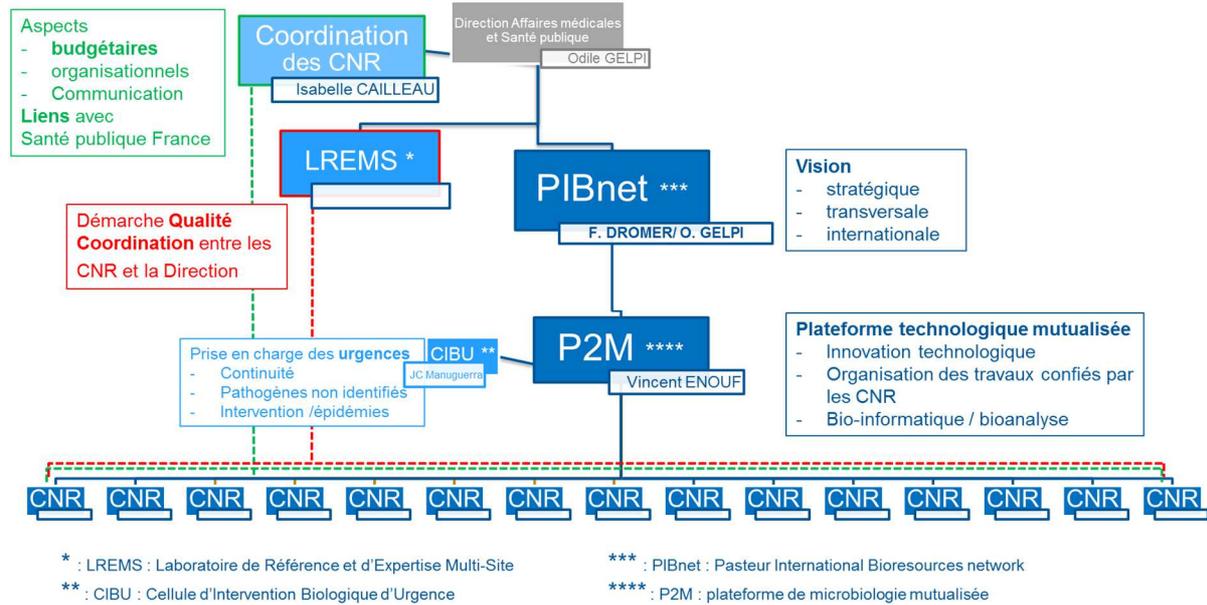
2.1.1. Organisation des CNR à l'Institut Pasteur

Les premiers laboratoires de l'Institut Pasteur à être désignés CNR l'ont été en 1974. La Direction de l'Institut Pasteur a alors souhaité une organisation transversale permettant de coordonner les différents CNR et de les aider dans leurs démarches. Cette structure, appelée Commission des Laboratoire de Référence et d'Expertise (CLRE) était pilotée par l'un des directeurs de CNR de l'Institut Pasteur élu par ses pairs pour la durée de la mandature. Elle a eu essentiellement un rôle d'animation et assurait, par le biais de son président et de sa secrétaire, l'interface avec la Direction des Affaires Médicales et de Santé Publique. Le président actuel en est Vincent Enouf, directeur adjoint du CNR des Virus Influenzae. À partir de 2010, dans la perspective de répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 (loi 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale), l'Institut Pasteur a fédéré les 15 CNR et 4 laboratoires associés placés sous sa responsabilité, ainsi que la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU) en une structure fonctionnelle dénommée Laboratoire de Référence et d'Expertise MultiSite (LREMS). En 2014 a été créée une structure transversale appelée « Pasteur International Bioresources network » (PIBnet) composée du LREMS, mais aussi d'une plateforme de haute technologie, des collections internationales de micro-organismes hébergées à l'Institut Pasteur et des laboratoires de référence du Réseau International des Institut Pasteur.

L'évolution de cette structuration au cours du temps traduit la volonté de l'Institut Pasteur de prendre en compte de façon optimisée les activités liées aux missions de santé publique qui font partie historiquement de son périmètre et de sa stratégie. La dimension internationale, par le relai constitué autour de son Réseau international, constitue à l'heure actuelle un atout dans un contexte d'émergence ou de réémergence de pathogènes susceptibles d'impacter la santé publique en France, que ce soit en métropole ou dans les territoires ultra-marins. Parallèlement, l'activité de ses unités, tant en recherche fondamentale qu'en recherche technologique, lui donne aujourd'hui une capacité d'innovation au service de la santé publique.

Ainsi, au cours du dernier mandat, la structuration autour de PIBnet et de sa plateforme de microbiologie mutualisée (P2M) a permis de faire la démonstration de l'intérêt pour la santé publique d'accéder, grâce à l'innovation technologique et organisationnelle, à des données scientifiques nouvelles. Il apparaît clairement aujourd'hui, pour les structures les plus avancées dans cette démarche, qu'une vraie « valeur ajoutée » est associée à ces nouvelles techniques, non seulement utile, mais nécessaire aux autorités nationales pour prendre les meilleures décisions, le plus rapidement possible, pour la protection de la population et de son environnement. Par ailleurs, cette démarche permet de situer la santé publique française à un niveau de reconnaissance internationale.

Figure 1. Organigramme fonctionnel des CNR à l'Institut Pasteur



L'appel à candidatures lancé par l'Agence nationale de Santé publique pour la nomination des Centres nationaux de Référence couvre la période 2017-2021. L'évolution technologique évoquée ci-dessus, aboutie ou en cours selon les pathogènes, paraît inéluctable dans la période couverte par la prochaine mandature. C'est donc logiquement que ces éléments sont pris en compte dans les projets proposés pour répondre aux cahiers des charges spécifiques de chaque pathogène ou groupe de pathogènes. Ainsi, on observe la substitution de nouvelles techniques (tel par exemple le séquençage de nouvelle génération) venant remplacer des techniques standard, dont certaines constituaient la référence depuis de nombreuses décennies.

Ce virage vers une santé publique plus moderne, grâce aux technologies actuelles, implique sans doute un changement de modèle économique. L'expérience acquise au cours de ces dernières années a permis à l'Institut Pasteur de développer une comptabilité analytique, donnant aujourd'hui la capacité de calculer les coûts de l'utilisation de ces nouvelles techniques de manière précise, et permettant de démontrer, comme cela a par ailleurs été fait au niveau international¹, l'intérêt en santé publique. Compte tenu du caractère néanmoins précoce de l'utilisation de ces techniques, il semble que des études médico-économiques doivent être conduites, dans un périmètre naturellement beaucoup plus large que celui des CNR, du fait de l'impact en santé communautaire ou hospitalière, et du fait de la diversité des sources de financement de la santé publique, et de la santé (Etat, Sécurité Sociale, ...). Une étude économique, « du point de vue de la Sécurité Sociale », financeur principal de la santé en France, qui ferait par exemple ressortir les « coûts évités », apparaît indispensable pour avoir une vision exacte de l'intérêt de ces nouvelles techniques, elles-mêmes financées par une autre source de financement. L'Institut Pasteur est prêt à partager son expérience et ses données avec Santé Publique France pour monter et mener à bien de telles études.

Parallèlement, la nécessité de développer des interfaces avec la surveillance animale est un enjeu qu'il convient de prendre en compte ; la mise en commun des connaissances pourrait être facilitée par le partage de ces outils. Dans ce contexte, l'Institut Pasteur œuvrera pour un rapprochement CNR/LNR, en engageant des discussions pour redynamiser le partenariat avec l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES).

La réponse de l'Institut Pasteur à l'appel à candidatures est formulée en tenant compte de ces éléments ; à côté d'une partie spécifique, et répondant aux cahiers des charges particuliers spécifiques à tel ou tel pathogène (ou groupe de pathogènes), elle comprend une partie commune à l'ensemble des projets de CNR, décrivant l'organisation générale

¹ Etude de 2014 de l'USDA sur le coût de différents pathogènes : Cost Estimate of Foodborne Illnesses : <http://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses.aspx>

et les moyens supports mis à disposition des unités hébergeant un CNR, de manière à permettre à chaque CNR de répondre à ses missions dans les meilleures conditions.

2.2. Moyens du laboratoire candidat

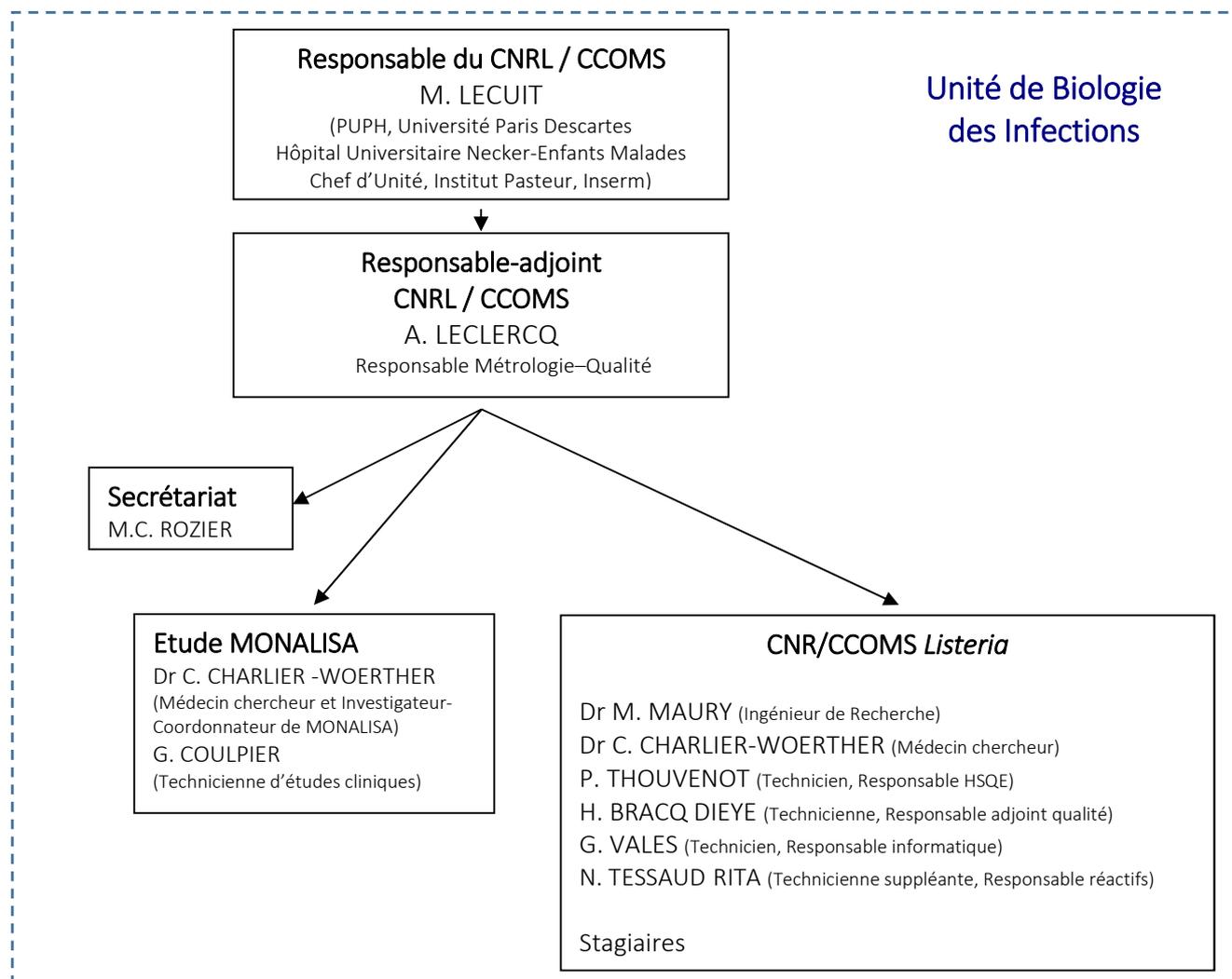
2.2.1. Ressources humaines

2.2.1.1. Le Responsable scientifique

Marc Lecuit est Professeur à l'Université Paris Descartes et Praticien hospitalier à l'Hôpital Universitaire Necker Enfants Malades, adjoint au chef du Service des Maladies Infectieuses et Tropicales (Centre d'infectiologie Necker-Pasteur). Il dirige à l'Institut Pasteur l'Unité de Biologie des Infections, également labellisée Unité Inserm U1117, le CNRL et le CCOMS *Listeria*.

2.2.1.2. Organigramme général

Figure 2. Organigramme du CNR des *Listeria*



2.2.1.3. Etat des emplois rémunérés - Effectif

L'effectif du personnel du CNRL est présenté dans le Tableau 2.

Les personnels du CNRL possèdent collectivement une expertise médicale clinique et microbiologique, 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 2. 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 (CV en annexe A du présent dossier)	1
MAURY Mylène	Ingénieur de recherche confirmé	0,5
CHARLIER-WOERTHER Caroline	Médecin, Chercheur	0,2**
THOUVENOT Pierre	Technicienne supérieure de laboratoire	1
VALES Guillaume	Technicien supérieur de laboratoire	1
BRACQ DIEYE Hélène	Technicienne supérieure de laboratoire	1
ROZIER Marie-Christine	Secrétaire	0,5
TOTAL Equivalent Temps Plein (ETP)		5,4

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

** Personnel non financé par SPF.

2.2.2. 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 3 hébergent le CNRL et le Centre collaborateur de l'OMS des *Listeria* (CCOMS).

Locaux du CNRL (Figure 3) :

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

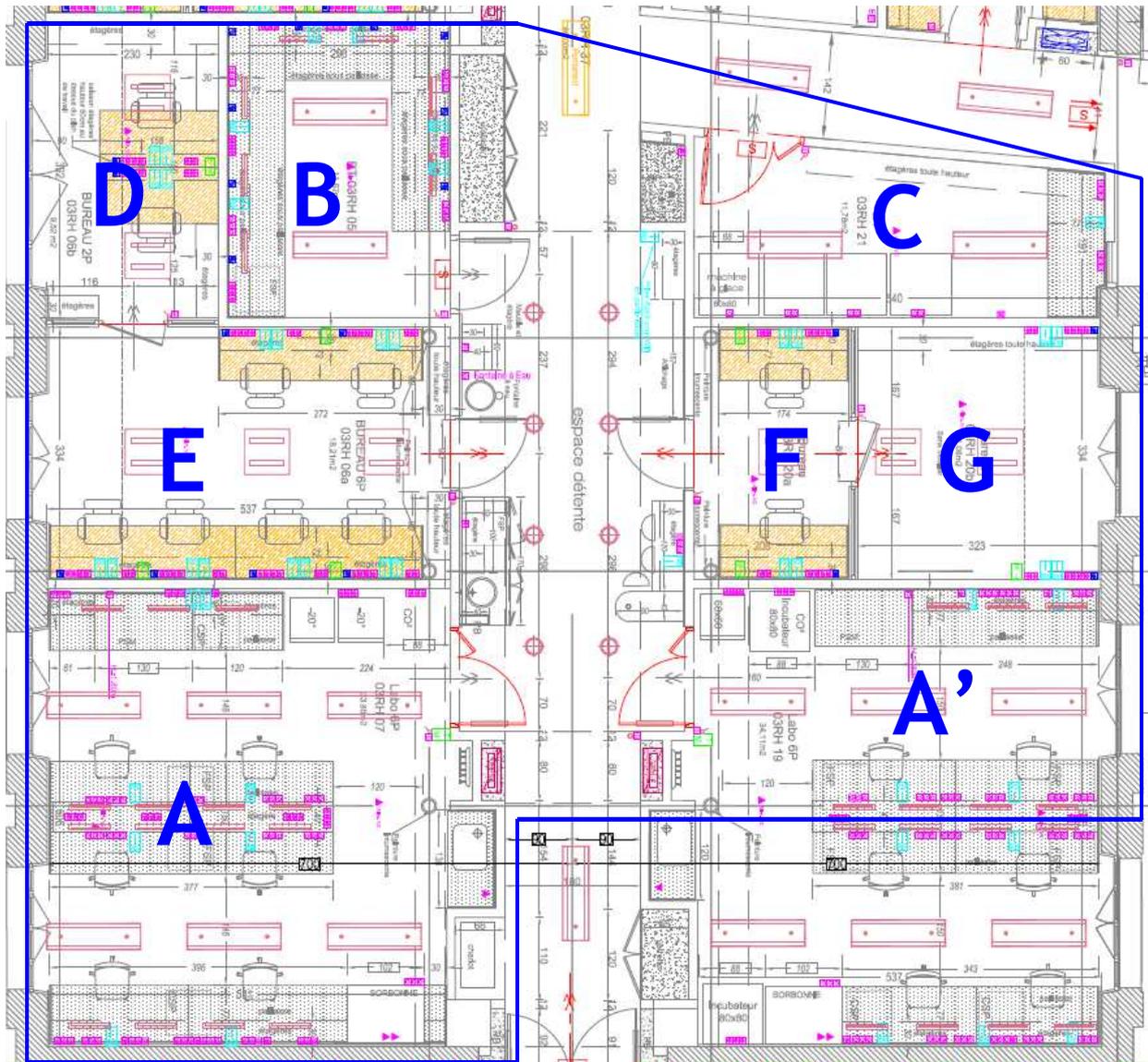
3 pièces de bureaux dédiées (D, E, F)

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 3. Plan des locaux du CNR des *Listeria*. Les Lettres bleues sont définies dans le chapitre 2.2.2.



2.2.3. Equipements

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.

De 2011 à 2015, 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 réglementaire 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,
- 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, 2 imprimantes) est en location et géré par une société privée en contrat avec l'Institut Pasteur. Cette société est soumise à un contrat de confidentialité et de respect des exigences CNIL pour les données de santé publique et celles des correspondants du laboratoire. Le parc informatique est renouvelé tous les 3-4 ans.

Moyens extérieurs à la structure / Structures transversales

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

2.2.4. Plan de continuité d'activité

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.

2.3. Descriptif des thématiques de recherche du laboratoire candidat

L'Unité de Biologie des Infections (www.pasteur.fr/research/biu) étudie les mécanismes biologiques des infections invasives, et notamment celles dues à des microorganismes responsables d'infections du système nerveux central, et néonatales. Les pathogènes modèles étudiés sont principalement *Listeria monocytogenes*, ainsi que le streptocoque du groupe B, et le virus Chikungunya, dont nous avons montré qu'il était capable d'induire des infections néonatales et que celles-ci se caractérisaient par leur gravité et la dissémination du virus au système nerveux central.

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

Nous utilisons des approches classiques de microbiologie moléculaire et de biologie cellulaire, en combinant des analyses *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Nous utilisons des techniques d'imagerie dynamique et en temps réel pour visualiser et étudier le processus infectieux au niveau tissulaire, *in vitro* et *in vivo*.

En complément de ces approches expérimentales et fondamentales, nous développons une approche génomique, visant à étudier, décrire et comprendre la biodiversité au sein du genre *Listeria*, et particulièrement de l'espèce *monocytogenes*, dans l'objectif d'identifier de la façon la plus exhaustive les facteurs de *Lm* associés à sa virulence.

Cette approche a deux objectifs complémentaires : mieux comprendre la physiopathologie de l'infection et identifier des marqueurs moléculaires qui pourraient être associés au pouvoir pathogène des isolats.

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

2.4. Capacités techniques du laboratoire candidat

2.4.1. Méthodes 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 (DGAI), la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) ou dans le cadre d'investigations autour de cas ou d'autocontrôles.

Les souches font systématiquement l'objet des analyses suivantes:

- **Vérification de la pureté** des souches réceptionnées sur gélose nutritive. 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 [15]. 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, 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.

Cette technique de spectrométrie de masse Maldi-Tof a été validée par l'analyse de plus de 280 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 [16] et amendée en 2011 [17]. 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 [18, 19].

- **Séquençage du génome des souches en routine.** 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://bigsdbs.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 InlA 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.

- **Analyse des profils de macrorestriction d'ADN génomique** (électrophorèse en champ pulsé ou PFGE), en cas de nécessité ou dans le cadre d'investigations internationales. Ces profils sont obtenus au moyen du système d'électrophorèse CHEF et des enzymes de restriction *AscI* 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 [20, 21]. Un dictionnaire de correspondance entre les profils PFGE et typage MLST a été développé par le CNRL [13, 22]. Cet outil permet l'identification du clone MLST de chaque souche analysée par PFGE.

Des analyses complémentaires peuvent également être effectuées, dans le cadre d'un criblage nécessitant un résultat rapide avant l'obtention des données de génomique, pour les besoins de projets de recherche ou pour approfondir une investigation dans le cadre de la surveillance nationale :

- **Typage rapide de souches.** Sur la base du schéma MLVA que le CNRL a établi, 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 [23]. Cette méthode permet de positionner rapidement les souches par rapport aux clones MLST majeurs et d'ainsi prédire le potentiel infectieux des souches [13].

- **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, dans le cadre de la transplantation de microbiote fécal.

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 au LABM de l'Hôpital Necker-Enfants Malades depuis 2004 en accord avec Santé Publique France.

2.4.2. Maintien, détention et diffusion de matériel biologique

2.4.2.1. 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'épidémiques et lors d'enquêtes ponctuelles autour d'un cas, à la demande de l'InVS, de la DGS, de la DGAL ou de la DGCCRF.
3. **alerte-produit** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de 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 pour identifier leur origine géographique, temporelle ou leur source.

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.

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 105 965 souches à la fin de l'année 2015. 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 64.781 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* [24, 25]. 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.

2.4.2.2. 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 [16], 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*.

2.4.2.3. 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.

A ce titre, en 2012, le CNRL a évalué l'efficacité du phage P100, vendu commercialement pour le traitement des denrées alimentaires, sur les souches humaines réceptionnées au CNRL sur l'année 2011.

2.4.2.4. Conditions de mise à disposition des collections

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité des CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est 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.

A 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. au Décret n°2016-806 du 16 juin 2016.

2.4.2.5. 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.

2.4.3. Maintien et détention des bases de données

2.4.3.1. 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) [22, 26], 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 la disposition de la communauté scientifique (<http://bigsdbs.pasteur.fr/listeria/listeria.html>). A la fin de l'année 2015, cette base de données contenait 7000 génomes publics ou privés de *Listeria*.

2.4.3.2. Les conditions de mises à disposition

L'accès aux données des bases relève des mêmes conditions que celles indiquées dans le chapitre 2.4.2.4.

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.

3. BILAN 2011-2015 DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES

3.1. Les activités au titre de l'expertise microbiologique

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.

3.1.1. Contributions aux études épidémiologiques

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

*Synthèse sur la surveillance de *Listeria monocytogenes* dans les aliments*

En collaboration avec Sophie Roussel (ANSES), Julien Santolini (DGAI), Anselme Agbessi (DGCCRF), Renaud Lailier (ANSES), Nathalie Pihier (DGAI), Anne Brisabois (ANSES).

*Article publié : Roussel, S., Leclercq, A., Santolini, A., Agbessi, A., Chenal-Francisque, V., Lailier, R., Lecuit, M., Pihier, N., Brisabois, A. 2012. Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments. BEH Hors Série. 9 mai 2012 : 41-45.*

Abstract : *Listeria monocytogenes* est une bactérie ubiquitaire largement répandue dans l'environnement, transmise à l'homme suite à l'ingestion d'aliments contaminés et à l'origine de cas rares mais graves chez l'Homme. Cette situation justifie la mise en place d'une surveillance de la bactérie dans les principales filières de transformation des produits carnés, laitiers, des produits de la mer et des produits végétaux. Ces filières constituent les principales sources de contamination des aliments notamment en production agro-alimentaire, soit à partir des matières premières, soit à partir de l'environnement où des souches peuvent devenir résidentes. Les plans nationaux de surveillance et de contrôle récents ont permis de cibler les filières de transformation les plus à risque. L'ensemble des mesures mises en place par l'industrie agro-alimentaire et les autorités, tant dans le domaine de la surveillance que de la gestion en cas de non-conformité, contribue à la maîtrise de la contamination et à la réduction de l'exposition des populations. De plus, les analyses de caractérisation des souches isolées des aliments permettent une surveillance moléculaire des populations de souches circulant dans ces filières, une possible identification de l'aliment contaminé et apportent également des éléments complémentaires dans l'investigation épidémiologique des cas, et plus généralement dans l'évaluation du risque.

Listériose humaine : situation en France et en Europe

En collaboration avec Véronique Goulet, Edith Laurent, Lisa King, Véronique Vaillant, Marie-Jo Letort, Henriette de Valk (InVS/SPF)

Article publié : Goulet, V., Leclercq A., Laurent E., King, L.A., Chenal-Francisque, V., Vaillant, V., Letort, M.J., Lecuit, M., de Valk, H. 2012. Surveillance de la listériose humaine en France, 1999-2011. BEH Hors Série. 9 mai 2012 : 38-40.

Abstract : La listériose humaine est une maladie bactérienne qui se transmet par l'ingestion d'aliments contaminés. C'est une maladie à déclaration obligatoire. Le médecin de l'agence régionale de santé a pour mission d'interroger les patients sur leur consommation alimentaire et de transmettre les informations à l'InVS. Le centre national de référence des *Listeria* (CNRL) situé à l'Institut Pasteur, contribue à la surveillance en caractérisant et génotypant les souches envoyées par les laboratoires. Ce typage permet de détecter rapidement les cas infectés simultanément avec une souche du même génotype, et à l'InVS de rechercher une source alimentaire commune dans les interrogatoires des cas signalés par le CNRL. En cas de suspicion d'une source commune, les investigations complémentaires sont effectuées par la direction générale de l'alimentation et leurs services départementaux. Depuis 2001, six investigations ont permis d'identifier une source commune et d'éviter une situation épidémique préoccupante. Depuis 2006, l'incidence reste assez stable autour de 0,5 cas/ 100 000 d'habitants avec chaque année environ 300 cas, 50 décès et une douzaine de mort-fœtale ou de mort-nés. Les formes materno-néonatales représentent 15% des

cas avec un ratio de 5 cas/100 000 naissances. L'incidence actuelle est proche de celle rapportée par la plupart des pays européens où l'on observe également une stabilité de l'incidence depuis 2007.

Encéphalites à *Listeria monocytogenes* en France

En collaboration avec Alexandra Mailles (InVS/SPF)

Article publié : Mailles, A., M. Lecuit, V. Goulet, A. Leclercq, J. P. Stahl. 2012. *Listeria monocytogenes* encephalitis in France. *Med Mal Infect* 41:594-601.

Abstract : Il s'agit de décrire les caractéristiques des patients atteints d'encéphalite listérienne inclus dans une étude nationale sur les encéphalites. *Listeria monocytogenes* était la quatrième plus fréquente cause d'encéphalite identifiée dans une étude prospective menée en France en 2007. Il est décrit 12 cas d'encéphalite listérienne (sept rhombocéphalites et cinq encéphalites) et sont comparés aux patients atteints d'encéphalite d'autres origines étiologiques, et aux neurolistérioses notifiées durant la même année dans le cadre de la déclaration obligatoire. Les souches de *L. monocytogenes* des 12 patients appartenaient aux génotypes IVb ($n = 6$), IIa ($n = 3$) et IIb ($n = 3$). La protéinorachie médiane était de 2,5 g/L and la pléiocytose médiane de 367 cellules/mm³. Sept patients sur 12 présentaient des comorbidités. La létalité au cours de l'hospitalisation était de 50 %. Les patients à encéphalite listérienne inclus dans l'étude n'étaient pas différents de ceux recensés dans la déclaration obligatoire en termes de caractéristiques démographiques et de comorbidités. Ils étaient cependant significativement plus âgés et avaient plus fréquemment un cancer ou un traitement par corticostéroïdes que les patients de l'étude atteints d'une encéphalite d'une autre origine. En raison de son issue souvent défavorable, la neurolistériose doit être évoquée rapidement chez les patients atteints d'encéphalite pour en optimiser la prise en charge.

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.

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.

Coopération des systèmes de surveillance français et belge et utilisation de la plateforme EPIS dans le cadre de la gestion d'une épidémie belge

En collaboration avec S. Bertrand (CNR Listeria Belge, ISP)

Article publié : M. Yde, M. Naranjo, W. Mattheus, P. Stragier, B. Pochet, K. Beulens, K. De Schrijver, D. Van den Branden, V. Laisnez, W. Flipse, A. Leclercq, M. Lecuit, K. Dierick, S. Bertrand. 2012. Usefulness of the European Epidemic Intelligence Information System in the management of an outbreak of listeriosis, Belgium, 2011. Euro Surveill 17 (38).

Abstract : Un groupe de cas liés dans le temps et l'identification d'une souche clonale suggère l'occurrence d'une épidémie à *Listeria monocytogenes* en Belgique en 2011, vraisemblablement en raison de la consommation d'un fromage à pâte dure fait à base de lait pasteurisé et produit par un fabricant de la Belgique. Le clone épidémique a été identifié comme *L. monocytogenes* serotype 1/2a, sensible à l'arsenic et le cadmium et de type MLST 37. L'enquête alimentaire de cette épidémie a été facilitée par le Système d'information d'Intelligence Épidémique et les données échangées entre les systèmes de surveillance français et Belge. Le système français ayant pu détecter le profil des souches humaines belges dans sa surveillance nationale au niveau de souches d'alertes-produits ce qui a permis d'identifier le produit incriminé dans cette épidémie.

Analyse des Urgent Inquiries ECDC

En coordination avec C. Gossner (ECDC)

Article publié: Gossner, C.M., de Jong, B., Hoebe, C.J., Coulombier, D.; European Food and Waterborne Diseases Study Group (Leclercq A.). 2015. Event-based surveillance of food- and waterborne diseases in Europe: urgent inquiries (outbreak alerts) during 2008 to 2013. Euro Surveill. 20(25):19-28.

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

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

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

Etude des formes materno-néonatales de listériose en France, 1984-2011

En collaboration avec V. Goulet et D. Girard (INVS)

Article publié : Girard, D., A. Leclercq, E. Laurent, M. Lecuit, H. de Valk, V. Goulet. 2014. Pregnancy-related listeriosis in France, 1984 to 2011, with a focus on 606 cases from 1999 to 2011. Euro Surveill 19 (38).

Abstract: This study describes trends in the incidence of pregnancy-related listeriosis in France between 1984 and 2011, and presents the major characteristics of 606 cases reported between 1999 and 2011 to the French Institute for Public Health Surveillance through the mandatory notification system. The incidence of pregnancy-related listeriosis decreased by a factor of 12 from 1984 to 2011. This reduction was a result of progressive implementation of specific *Listeria monocytogenes* control measures in food production. A lower incidence of pregnancy-related listeriosis was observed in regions with a lower prevalence of toxoplasmosis. Given that dietary recommendations in pregnancy target both toxoplasmosis and listeriosis prevention, we suppose that recommendations may have been delivered and followed more frequently in these regions. Cases reported between 1999 and 2011 (n=606) were classified as maternal infections with ongoing pregnancy (n=89, 15%), fetal loss (n=166, 27%), or live-born neonatal listeriosis (n=351, 58%). The majority of live-born neonatal listeriosis cases (n=216, 64%) were preterm births (22–36 weeks of gestation), of whom 14% (n=30) were extremely preterm births (22–27 weeks of gestation). Eighty per cent of mothers reported having eaten high risk food during pregnancy. A better awareness of dietary recommendations in pregnant women is therefore necessary.

Synthèse sur la contamination des produits de la mer et impact en santé publique

En collaboration avec Sophie Roussel (ANSES), Anne Brisabois (ANSES), Jean-Christophe Augustin (ENV Alfort), Véronique Vaillant (InVS), Alain Mimouni (CTCPA), Pauline Kooh (ANSES).

Publication d'un avis de l'Anses relatif à la demande de réévaluation des produits de la mer à risque pour les femmes enceintes dans le guide PNNS « Le guide nutrition pendant et après la grossesse »

Suite à la saisie de l'ANSES en 2012 par la DGS d'une demande de réévaluation des produits de la mer à risque pour les femmes enceintes dans le guide PNNS « nutrition pendant et après la grossesse » auquel le CNRL a participé, le CNRL et le LNRL ont décidé de réactualiser l'étude française de Rocourt, J., Jacquet, Ch., et A. Reilly. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. Int. J. Food Microbiol. 62 :197-209. Le LNRL et le laboratoire de l'ANSES de Boulogne Sur Mer ont communiqué au CNRL les caractéristiques microbiologiques des souches de produits de la mer qu'ils détenaient. Une première synthèse a été réalisée par le CNRL pour répondre à la saisie de la DGS puis maintenant une étude plus exhaustive de classification des souches par produits de la mer et comparaison aux caractéristiques microbiologiques des souches humaines est en cours. Il s'agit de confirmer ou d'infirmer que comme les produits de la mer ont donné peu d'épidémies sauf les produits de saumon, leurs souches seraient potentiellement moins ou non virulentes pour l'homme.

En 2012, la cellule *Listeria* a identifié d'autres groupes à risque de listériose que les femmes enceintes ou les personnes atteintes d'hémopathies et de cancers digestifs, qui nécessiteraient des informations et recommandations sur le risque *Listeria*.

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.

3.1.2. Méthodes de diagnostic et caractérisation de 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

Abstract: *Listeria monocytogenes* is an intracellular pathogen that escapes from the phagosome of host cells using the listeriolysin O (LLO). This critical virulence factor is encoded by *hly*, a gene located in the *Listeria* Pathogenicity Island 1 (LIPI-1), whose transcription is activated by PrfA, the major transcriptional regulator of virulence genes in *L. monocytogenes*. Furthermore, the β -haemolytic activity of *L. monocytogenes* conferred by LLO is a key phenotypic marker used for *L. monocytogenes* identification in clinical and food microbiology. The National Reference Center for *Listeria*, which is in charge of the epidemiological surveillance of listeriosis in France, identified 60 non-haemolytic *L. monocytogenes* strains. As these atypical *L. monocytogenes* strains could be misidentified as non-pathogenic *Listeria* species during investigation of human clinical cases and during analysis of the microbiological quality of food, the characterization of these non-haemolytic strains is of major importance. We analysed the 60 non-haemolytic *L. monocytogenes* strains isolated from food and human sources. Non-haemolytic strains are phylogenetically very diverse and the loss of haemolytic capacity can be caused by several independent genetic events. Molecular investigations revealed that the absence of haemolytic activity can result from nonsense and missense mutations in *prfA* and/or *hly*, and from an abnormally long PrfA protein due to reversion of the wild type stop codon. Strains carrying a G299V mutation in LLO or a truncated LLO at position 483 showed a reduced virulence in mice as compared to a wild type strain. However, non-haemolytic *L. monocytogenes* strains are still able to cause infections in human as two of the 60 analysed non-haemolytic strains were isolated from infected patients.

Développement d'une méthode d'isolement de Lm dans les selles et études de gastroentérites à Lm

Communication orale présentée A. Leclercq: Febrile and septicemic gastroenteritis due to L. monocytogenes. ISOPOL, Goa (Inde), 2013

Abstract: The foodborne origin of listeriosis has been demonstrated epidemiologically by Schlech III *et al.*, but the existence of gastrointestinal symptoms was not mentioned in this seminal study. Outbreaks of febrile gastroenteritis due to *Lm* have been described but systemic listeriosis is usually not observed in this setting. However, clinical studies have clearly shown that gastroenteritis often precedes the development of invasive listeriosis, even though the proof that *Lm* is the causative agent of this gastroenteritis preceding invasive listeriosis has not been formally established. Here, we have investigated cases of invasive listeriosis preceded by gastroenteritis notified recently to the Reference National Centre, obtained stools concomitant of this gastroenteritis episode, and developed a method to isolate *Lm* from stools samples, compared isolates from stool and blood samples.

Three cases of gastroenteritis preceding invasive listeriosis were studied. *Lm* was isolated from stool samples using ALOA™ medium (AES Laboratories, France), and the haemolytic activity of the isolate assessed on blood agar plate. For each patient, stool and blood *Lm* isolates belonged to the same serotype (1/2a and 1/2b) and exhibited similar combined *Ascl/ApaI* PFGE profiles. In these 3 isolates, the *inlA* gene did not encode a truncated InlA, transcription of *inlA* was demonstrated by qPCR and expression of a full-length InlA was detected on the surface of bacteria by IFI. Invasion assays in guinea pig fibroblasts transfected or not with human E-cadherin cDNA demonstrated the ability of these three isolates to invade cells in an InlA-dependent manner.

These results provide clinical and microbiological evidence that *Lm* induces febrile gastroenteritis prior to its systemic dissemination. They also indicate the in case of febrile gastroenteritis where other classical foodborne gastrointestinal pathogens are not detected, detection of *Lm*, notably in population at risk for listeriosis, may allow early antimicrobial therapy and prevent the severe complications of systemic listeriosis.

Caractérisation des souches de *L. monocytogenes* de sérotype 4ab

En collaboration avec le pôle d'identification biologique de la CIBU (A. Le Fleche) et l'Environmental Research Institute and Department of Microbiology, University College Cork, Ireland (M. Achtman)

Poster A. Leclercq, V. Cadet-Daniel, A. Morvan, T. Cantinelli, V. Chenal-Francisque, and M. Lecuit. Does Listeria monocytogenes serovar 4ab exist? ISOPOL, Goa (Inde), 2013, Abstract P/DS/09 page 87.

Abstract: Thirteen *Lm* serovars have been described (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e and 7), yet the existence of serovar 4ab is debated. The aim of our study was to further characterize "4ab" isolates deposited in the World Health Organization Collaborating Centre for *Listeria* (WHOCCL) collection by phenotypical tests, 16S rDNA and *iap* gene sequencing, and study by MLST their position in the structure of *Lm* population.

We retrieved 32 isolates from the collection of the WHOCCL typed as *Lm* serovar 4ab. Only one of these 32 strains was confirmed as a *Lm* serovar 4ab. MLST showed that this unique 4ab *Lm* isolate belongs to a clonal complex of serovar 4c strains, suggesting that this 4ab isolate derives from 4c strains. Importantly, the two serotyping reference 4ab strains CLIP 74909 (=SLCC 4951) and CLIP 73010 are both *L. innocua* and belong to serovar 6b.

These results confirm the existence of *Lm* serovar 4ab. The analysis of the genomic sequence of *Lm* CLIP 17147 isolate will help clarify its position in the *Lm* species and other species of this genus.

Une note corrective et d'actualisation du schéma de sérotypage classique par agglutination est en cours de rédaction.

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

En collaboration avec Marcel R. Eugster et Martin J. Loessner (Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zurich, Switzerland).

*Article publié : Eugster, M. R., Morax, L. S., Huls, V. J., Huwiler, S. G., Leclercq, A., Lecuit, M., Loessner, M. J. 2015. Bacteriophage predation promotes serovar diversification in *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol. 97(1):33-46.*

Abstract: *Listeria monocytogenes* is a bacterial pathogen classified into distinct serovars (SV) based on somatic and flagellar antigens. To correlate phenotype with genetic variation, we analyzed the wall teichoic acid (WTA) glycosylation genes of SV 1/2, 3, and 7 strains, which differ in decoration of the ribitol-phosphate backbone with N-acetylglucosamine (GlcNAc) and/or rhamnose. Inactivation of *Lmo1080* or the dTDP-l-rhamnose biosynthesis genes *rmlACBD* (*Lmo1081-1084*) resulted in loss of rhamnose, whereas disruption of *Lmo1079* led to GlcNAc deficiency.

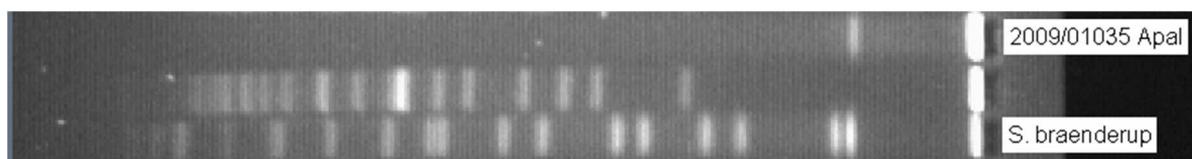
We found that all SV 3 and 7 strains actually originate from a SV 1/2 background, as a result of small mutations in WTA rhamnosylation and/or GlcNAcylation genes. Genetic complementation of different SV 3 and 7 isolates using intact alleles fully restored the characteristic SV 1/2 WTA carbohydrate pattern,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

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

Etude d'un profil atypique en *Apal*

Un profil de restriction *Apal* atypique a été découvert en 2009 (Figure 4), suggérant une erreur technique. Après investigation, ce nouveau profil a été identifié dans un autre laboratoire (EU-RL *Listeria monocytogenes*) et dans le réseau Pulsenet USA et Canada. L'analyse de souches présentant un profil similaire est en cours pour comprendre ce phénomène. Un manuscrit est en cours de rédaction.

Figure 4. Profil atypique (CLIP 2009/01035) apparu en 2009 ne comportant qu'une seule bande en PFGE *Apal*. *S. braenderup* est utilisée pour générer le marqueur de poids moléculaire.



3.1.3. Analyses 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.

Les données disponibles sur la présentation clinique, biologique ou encore les facteurs pronostiques de l'infection sont issues d'études rétrospectives hétérogènes. Le CNRL a mis en place depuis 2009 une étude prospective cas-témoins permettant de recueillir toutes les données cliniques de patients atteints de listériose et de patients contrôles, avec leurs échantillons biologiques (ADN, PBMC, serum, plasma). L'étude MONALISA est financée par un programme hospitalier de recherche clinique, et coordonnée par C. Charlier (Responsable scientifique M. Lecuit).

La première phase d'inclusion s'est déroulée de Novembre 2009 à Juillet 2013. Elle a permis de collecter les échantillons de 818 malades (427 infections S, 252 infections N et 107 infections MN) et 456 témoins. Les inclusions des formes neurologiques et materno-néonatales se poursuivent, et depuis Septembre 2013, 126 malades supplémentaires ont été inclus, dont 81 formes N, 39 formes MN et 6 autres formes rares.

Les premières analyses des données ont été présentées à ISOPOL 2016 (Article en soumission) selon l'abstract suivant :

Abstract: Listeria monocytogenes (Lm) is a foodborne pathogen responsible for listeriosis. We conducted a prospective nationwide case-control study in France to investigate the clinical features and prognostic factors of listeriosis.

Surveillance of listeriosis in France is based on mandatory reporting to the Institut de Veille Sanitaire and voluntary submission of Lm strains to the National Reference Center for Listeria (NRCL). From November 2009 to July 2013, patients reported to the NRCL with microbiologically proven listeriosis and controls were evaluated at admission and after three months. Clinical and laboratory features were studied. Isolates were characterized. Predictors of mortality were identified by logistic regression.

We included 818 listeriosis cases (107 maternal-neonatal, 427 septicemias, 252 neurolisteriosis, 32 others) and 456 controls. Maternal cases had similar presentation than controls, but 6-times more fetal losses (20% vs. 3%, P<0.001); only five percent had uneventful pregnancy and delivery. Neurolisteriosis mostly consisted in meningoencephalitis (84%); brainstem involvement was equally reported in cases and controls (17%). Three-month mortality was higher for septicemia than neurolisteriosis (45% vs. 30%, P<0.001). The most significant predictors of mortality in septicemia and neurolisteriosis were ongoing cancer, multi-organ failure, exacerbation of a pre-existing condition and monocytopenia (P<0.001). Neurolisteriosis mortality was higher for patients with positive blood cultures (40% vs. 23%, P=0.002) or receiving adjunctive dexamethasone (47% vs. 27%, P=0.008); neurolisteriosis cases with positive blood cultures had the same outcome as patients with septicemia alone. Survival was higher in patients with septicaemia and neurolisteriosis receiving beta-lactam active against Listeria (66% vs. 11%, P<0.001) or aminoglycoside (69% vs. 46%, P<0.001). A 6-items prognostic score correlated with mortality in neurolisteriosis (0-1: 9%, 2: 33% and 3-6: 74%). Long-term neurological impairment was evidenced in 75/150 (50%) of patients with encephalitis at baseline.

The specificity of listeriosis lies in its severe morbi-mortality rather than in any specific clinical features: indeed listeriosis almost always affects obstetrical outcome, while neurolisteriosis should still be considered one of the most severe neurological infections, with major mortality and long-term sequelae. Amoxicillin and gentamicin are the best first-line drugs for non-maternal listeriosis. Adjunctive dexamethasone is detrimental in neurolisteriosis.

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

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. (28 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 (**R**esistance in **G**ram-**N**egative **O**rganisms: **S**tudying **I**ntervention **S**trategies) 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 selles 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.

Infektions biliaries à *Listeria monocytogenes*

Article publié : C. Charlier, C. Fevre, L. Travier, B. Cazenave, H. Bracq-Dieye, J. Podevin, D. Assomany, L. Guilbert, C. Bossard, F. Carpentier, V. Cales, A. Leclercq, M. Lecuit. *Listeria monocytogenes*-Associated Biliary Tract Infections: A Study of 12 Consecutive Cases and Review. *Medicine (Baltimore)* 93:e105.

Abstract: At present, little is known regarding *Listeria monocytogenes*-associated biliary tract infection, a rare form of listeriosis. In this article, we will study 12 culture-proven cases reported to the French National Reference Center for *Listeria* from 1996 to 2013 and review the 8 previously published cases. Twenty cases were studied: 17 cholecystitis, 2 cholangitis, and 1 biliary cyst infection. Half were men with a median age of 69 years (32-85). Comorbidities were present in 80%, including cirrhosis, rheumatoid arthritis, and diabetes. Five patients received immunosuppressive therapy, including corticosteroids and anti-tumor necrosis factor biotherapies. Half were afebrile. Blood cultures were positive in 60% (3/5). Gallbladder histological lesions were analyzed in 3 patients and evidenced acute, chronic, or necrotic exacerbation of chronic infection. Genosero-group of the 12 available strains were IVb (n=6), IIb (n=5), and IIa (n=1). Their survival in the bile was not enhanced when compared with isolates from other listeriosis cases. Adverse outcome was reported in 33% (5/15): 3 deaths, 1 recurrence; 75% of the patients with adverse outcome received inadequate antimicrobial therapy (P=0.033). Biliary tract listeriosis is a severe infection associated with high mortality in patients not treated with appropriate therapy. This study provides medical relevance to in vitro and animal studies that had shown *Listeria monocytogenes* ability to survive in bile and induce overt biliary infections.

Infektions endovasculaires à *Listeria monocytogenes*

Poster M. Shoai-Tehrani, A. Leclercq, M. Lecuit, C. Charlier, on behalf of the endovascular listeriosis study group. 2013. *Endovascular listeriosis: a series of 12 consecutive cases. European congress of Clinical Microbiology and Infectious diseases, Berlin, Allemagne, 2013. Poster. Abstract P2098 page 171.*

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

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

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

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*

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.

Imagerie cérébrale de la neurolistériose: une étude prospective de 71 patients

Présentation Orale C. Charlier. Présentation Orale. Neuroradiology imaging in neurolisteriosis: a prospective series from 71 patients. 25th ECCMID, Copenhagen, Avril 2015.

Présentation Orale C. Charlier. Présentation Orale. Imagerie Cérébrale de la neurolistériose : série prospective de 71 dossiers neuroradiologiques. JNI, Nancy, Juin 2015.

Abstract: Neurolisteriosis is a rare and severe foodborne infection due to *Listeria monocytogenes* and associated with a mortality rate of 30%. The radiological features of neurolisteriosis have not been studied in detail.

Analysis of the neuroradiological files from 71 patients with documented neurolisteriosis included in the French prospective MONALISA cohort from November 2009 to July 2013.

Median age was 70 years. Fifty-six % of the patients were men; 82% had symptoms evocative of encephalitis. Brainstem symptoms were reported in 28% of the patients for whom brain imaging was performed and collected. Patients had 1 to 3 imaging procedures. The first one was performed in average 3 days after diagnosis (range: 5 days before to 40 days after diagnosis). A total of 54 magnetic resonance imaging (MRI) and 39 computed tomography scans (CT-scan) were collected and studied; 45 patients had at least one MRI. Images were reported abnormal in 58/71 (82%): in 5% and 35% of first MR and CT imaging procedures, respectively. Main abnormalities are summarized in Table 1.

Brain abscesses were unique (n=2) or multiple (n=4), and localized at the supra-tentorial or infra-tentorial level (N=3 and 2, respectively), or both (N=1). Nodular lesions were brain lesions that did not fulfill the criteria for brain abscesses. Brainstem involvement, defining rhombencephalitis, was globally reported by MRI for 6 patients (15%). Haemorrhagic lesions included brain haemorrhages (N=4), subdural and subarachnoid hematomas (N=3 and 5, respectively) and intraventricular haemorrhage (N=2). Radiological meningitis consisted in lepto-meningitis (N=2) and/or pachy-meningitis (N=13). Although MRI was performed after a lumbar puncture in all but one case that could be responsible for pachy-meningeal enhancement, images could be attributed to meningitis in 6 cases. Death was reported in 31% of the patients. No link between brain lesion type and poor outcome was identified.

MRI appears as more sensitive than CT to evidence brain radiological lesions in patients with neurolisteriosis. Non-specific white matter lesions and dilated Virchow Robin spaces were the most frequent lesions observed. Images of rhombencephalitis, although considered as evocative of neurolisteriosis, were only reported in 15% of cases. Haemorrhagic lesions were frequently reported.

3.1.4. Etude de la virulence

Etude de ActA de L. monocytogenes et biofilms

Article Publié : Travier, L., S. Guadagnini, E. Gouin, A. Dufour, V. Chenal-Francisque, P. Cossart, J. C. Olivo-Marin, J. M. Ghigo, O. Disson, M. Lecuit. 2013. ActA Promotes Listeria monocytogenes Aggregation, Intestinal Colonization and Carriage. PLoS Pathog 9:e1003131.

Abstract: *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a ubiquitous bacterium able to survive and thrive within the environment and readily colonizes a wide range of substrates, often as a biofilm. It is also a facultative intracellular pathogen, which actively invades diverse hosts and induces listeriosis. So far, these two complementary facets of *Lm* biology have been studied independently. Here we demonstrate that the major *Lm* virulence determinant ActA, a PrfA-regulated gene product enabling actin polymerization and thereby promoting its intracellular motility and cell-to-cell spread, is critical

for bacterial aggregation and biofilm formation. We show that ActA mediates *Lm* aggregation via direct ActA-ActA interactions and that the ActA C-terminal region, which is not involved in actin polymerization, is essential for aggregation *in vitro*. In mice permissive to orally-acquired listeriosis, ActA-mediated *Lm* aggregation is not observed in infected tissues but occurs in the gut lumen. Strikingly, ActA-dependent aggregating bacteria exhibit an increased ability to persist within the cecum and colon lumen of mice, and are shed in the feces three order of magnitude more efficiently and for twice as long than bacteria unable to aggregate. In conclusion, this study identifies a novel function for ActA and illustrates that in addition to contributing to its dissemination within the host, ActA plays a key role in *Lm* persistence within the host and in transmission from the host back to the environment.

Le CNRL étudie toutes les souches atypiques du CNRL floculant ou donnant des biofilms ou impliqués dans des infections particulières où un biofilm est suspecté de jouer un rôle.

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

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

Le rôle critique de la PI3-kinase dans la traversée des barrières de l'hôte par Listeria monocytogenes

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

Abstract: Invasion of nonphagocytic cells, a critical property of *Listeria monocytogenes* (*Lm*) that enables it to cross host barriers, is mediated by the interaction of two bacterial surface proteins, InIA and InIB, with their respective receptors E-cadherin and c-Met. Although InIA-E-cadherin interaction is necessary and sufficient for *Lm* crossing of the intestinal barrier, both InIA and InIB are required for *Lm* crossing of the placental barrier. The mechanisms underlying these differences are unknown. Phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) is involved in both InIA- and InIB-dependent pathways. Indeed, InIA-dependent entry requires PI3-K activity but does not activate it, whereas InIB-c-Met interaction activates PI3-K. We show that *Lm* intestinal target cells exhibit a constitutive PI3-K activity, rendering InIB dispensable for InIA-dependent *Lm* intestinal barrier crossing. In contrast, the placental barrier does not exhibit constitutive PI3-K activity, making InIB necessary for InIA-dependent *Lm* placental invasion. Here, we provide the molecular explanation for the respective contributions of InIA and InIB to *Lm* host barrier invasion, and reveal the critical role of InIB in rendering cells permissive to InIA-mediated invasion. This study shows that PI3-K activity is critical to host barrier permissiveness to microbes, and that pathogens exploit both similarities and differences of host barriers to disseminate.

Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection

Article publié: Blériot, C., T. Dupuis, G. Jouvion, G. Eberl, O. Disson, M. Lecuit. 2015. Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity.* 42(1):145-158.

Abstract: Kupffer cells, the phagocytes of fetal origin that line the liver sinusoids, are key contributors of host defense against enteroinvasive bacteria. Here, we found that infection by *Listeria monocytogenes* induced the early necroptotic death of Kupffer cells, which was followed by monocyte recruitment and an anti-bacterial type 1 inflammatory response. Kupffer cell death also triggered a type 2 response that involved the hepatocyte-derived alarmin interleukin-33 (IL-33) and basophil-derived interleukin-4 (IL-4). This led to the alternative activation of the monocyte-derived macrophages recruited to the liver, which thereby replaced ablated Kupffer cells and restored liver homeostasis. Kupffer cell death is therefore a key signal orchestrating type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated liver repair upon infection. This indicates that beyond the classical dichotomy of type 1 and type 2

responses, these responses can develop sequentially in the context of a bacterial infection and act interdependently, orchestrating liver immune responses and return to homeostasis, respectively.

Comparison of widely used Listeria monocytogenes strains EGD, 10403S, and EGD-e highlights genomic variations underlying differences in pathogenicity

Article publié: Bécavin, C., C. Bouchier, P. Lechat, C. Archambaud, S. Creno, E. Gouin, Z. Wu, A. Kühbacher, S. brisse, M.G. Pucciarelli, F. Garcia-del Portillo, T. Hain, D.A. Portnoy, T. Chakraborty, M. Lecuit, J. Pizarro-Cerda, I. Moszer, H. Bierne, P. Cossart. 2014. *Comparison of widely used Listeria monocytogenes strains EGD, 10403S, and EGD-e highlights genomic variations underlying differences in pathogenicity. MBio. 5(2):e00969-14.*

Abstract: For nearly 3 decades, listeriologists and immunologists have used mainly three strains of the same serovar (1/2a) to analyze the virulence of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. The genomes of two of these strains, EGD-e and 10403S, were released in 2001 and 2008, respectively. Here we report the genome sequence of the third reference strain, EGD, and extensive genomic and phenotypic comparisons of the three strains.

Strikingly, EGD-e is genetically highly distinct from EGD (29,016 single nucleotide polymorphisms [SNPs]) and 10403S (30,296 SNPs), and is more related to serovar 1/2c than 1/2a strains. We also found that while EGD and 10403S strains are genetically very close (317 SNPs), EGD has a point mutation in the transcriptional regulator PrfA (PrfA*), leading to constitutive expression of several major virulence genes. We generated an EGD-e PrfA* mutant and showed that EGD behaves like this strain in vitro, with slower growth in broth and higher invasiveness in human cells than those of EGD-e and 10403S. In contrast, bacterial counts in blood, liver, and spleen during infection in mice revealed that EGD and 10403S are less virulent than EGD-e, which is itself less virulent than EGD-e PrfA*. Thus, constitutive expression of PrfA-regulated virulence genes does not appear to provide a significant advantage to the EGD strain during infection in vivo, highlighting the fact that in vitro invasion assays are not sufficient for evaluating the pathogenic potential of *L. monocytogenes* strains. Together, our results pave the way for deciphering unexplained differences or discrepancies in experiments using different *L. monocytogenes* strains.

IMPORTANCE Over the past 3 decades, *Listeria* has become a model organism for host-pathogen interactions, leading to critical discoveries in a broad range of fields, including bacterial gene regulation, cell biology, and bacterial pathophysiology. Scientists studying *Listeria* use primarily three pathogenic strains: EGD, EGD-e, and 10403S. Despite many studies on EGD, it is the only one of the three strains whose genome has not been sequenced. Here we report the sequence of its genome and a series of important genomic and phenotypic differences between the three strains, in particular, a critical mutation in EGD's PrfA, the main regulator of *Listeria* virulence. Our results show that the three strains display differences which may play an important role in the virulence differences observed between the strains. Our findings will be of critical relevance to listeriologists and immunologists who have used or may use *Listeria* as a tool to study the pathophysiology of listeriosis and immune responses

Murinization of internalin extends its receptor repertoire, altering Listeria monocytogenes cell tropism and host responses

Article publié: Tsai, Y.H., O. Disson, H. Bierne, M. Lecuit. 2013. *Murinization of internalin extends its receptor repertoire, altering Listeria monocytogenes cell tropism and host responses. PLoS Pathog. 9(5):e1003381*

Abstract: *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is an invasive foodborne pathogen that leads to severe central nervous system and maternal-fetal infections. *Lm* ability to actively cross the intestinal barrier is one of its key pathogenic properties. *Lm* crosses the intestinal epithelium upon the interaction of its surface protein internalin (InlA) with its host receptor E-cadherin (Ecad). InlA-Ecad interaction is species-specific, does not occur in wild-type mice, but does in transgenic mice expressing human Ecad and knock-in mice expressing humanized mouse Ecad. To study listeriosis in wild-type mice, InlA has been "murinized" to interact with mouse Ecad. Here, we demonstrate that, unexpectedly, murinized InlA (InlA(m)) mediates not only Ecad-dependent internalization, but also N-cadherin-dependent internalization. Consequently, InlA(m)-expressing *Lm* targets not only goblet cells expressing lumenally-accessible Ecad, as does *Lm* in humanized mice, but also targets villous M cells, which express lumenally-accessible N-cadherin. This aberrant *Lm* portal of entry results in enhanced innate immune responses and intestinal barrier damage, both of which are not observed in wild-type *Lm*-infected humanized mice. Murinization of InlA therefore not only extends the host range of *Lm*, but also broadens its receptor repertoire, providing *Lm* with artifactual pathogenic properties. These results challenge the relevance of using InlA(m)-expressing *Lm* to study human listeriosis and in vivo host responses to this human pathogen.

Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis

Article publié: Archambaud, C., M.A. Nahori, G. Soubigou, C. Bécavin, L. Laval, P. Lechat, T. Smokvina, P. Langella, M. Lecuit, P. Cossart. 2012. *Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis*. PNAS USA. 109(41):16684-9.

Abstract: *Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen that crosses the intestinal barrier and disseminates within the host. Here, we report a unique comprehensive analysis of the impact of two *Lactobacillus* species, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-3689 and *Lactobacillus casei* BL23, on *L. monocytogenes* and orally acquired listeriosis in a gnotobiotic humanized mouse model. We first assessed the effect of treatment with each *Lactobacillus* on *L. monocytogenes* counts in host tissues and showed that each decreases *L. monocytogenes* systemic dissemination in orally inoculated mice. A whole genome intestinal transcriptomic analysis revealed that each *Lactobacillus* changes expression of a specific subset of genes during infection, with IFN-stimulated genes (ISGs) being the most affected by both lactobacilli. We also examined microRNA (miR) expression and showed that three miRs (miR-192, miR-200b, and miR-215) are repressed during *L. monocytogenes* infection. Treatment with each *Lactobacillus* increased miR-192 expression, whereas only *L. casei* association increased miR-200b and miR-215 expression. Finally, we showed that treatment with each *Lactobacillus* significantly reshaped the *L. monocytogenes* transcriptome and up-regulated transcription of *L. monocytogenes* genes encoding enzymes allowing utilization of intestinal carbon and nitrogen sources in particular genes involved in propanediol and ethanolamine catabolism and cobalamin biosynthesis. Altogether, these data reveal that the modulation of *L. monocytogenes* infection by treatment with lactobacilli correlates with a decrease in host gene expression, in particular ISGs, miR regulation, and a dramatic reshaping of *L. monocytogenes* transcriptome.

Transcytosis of Listeria monocytogenes across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin

Article publié: Nikitas, G., C. Deschamps, O. Disson, T. Niault, P. Cossart, M. Lecuit. 2011. *Transcytosis of Listeria monocytogenes across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin*. J. Exp. Med. 208(11):2263-77.

Abstract: *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a foodborne pathogen that crosses the intestinal barrier upon interaction between its surface protein InlA and its species-specific host receptor E-cadherin (Ecad). Ecad, the key constituent of adherens junctions, is typically situated below tight junctions and therefore considered inaccessible from the intestinal lumen. In this study, we investigated how *Lm* specifically targets its receptor on intestinal villi and crosses the intestinal epithelium to disseminate systemically. We demonstrate that Ecad is lumenally accessible around mucus-expelling goblet cells (GCs), around extruding enterocytes at the tip and lateral sides of villi, and in villus epithelial folds. We show that upon preferential adherence to accessible Ecad on GCs, *Lm* is internalized, rapidly transcytosed across the intestinal epithelium, and released in the lamina propria by exocytosis from where it disseminates systemically. Together, these results show that *Lm* exploits intrinsic tissue heterogeneity to access its receptor and reveal transcytosis as a novel and unanticipated pathway that is hijacked by *Lm* to breach the intestinal epithelium and cause systemic infection.

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, meningoencephalitis, brain abscesses and rhombencephalitis. This project aims to study comparatively and integratively human and ruminant neurolisteriosis on the level of the host (neurolisteriosis 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 neurolisteriosis 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.

Etude de souches hypovirulentes et avirulentes

En collaboration avec S. Roche (INRA UR 918 Pathologie infectieuse et Immunologie de Tours)

Article publié : Roche, S. M., O. Grepinet, A. Kerouanton, M. Ragon, A. Leclercq, S. Temoin, B. Schaeffer, G. Skorski, L. Mereghetti, A. Le Monnier, P. Velge. 2012. Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent Listeria monocytogenes isolates. BMC Microbiol 12:304.

Abstract: Currently, food regulatory authorities consider all *Listeria monocytogenes* isolates as equally virulent. However, an increasing number of studies demonstrate extensive variations in virulence and pathogenicity of *L. monocytogenes* strains. Up to now, there is no comprehensive overview of the population genetic structure of *L. monocytogenes* taking into account virulence level. We have previously demonstrated that different low-virulence strains exhibit the same mutations in virulence genes suggesting that they could have common evolutionary pathways. New low-virulence strains were identified and assigned to phenotypic and genotypic Groups using cluster analysis. Pulsed-field gel electrophoresis, virulence gene sequencing and multi-locus sequence typing analyses were performed to study the genetic relatedness and the population structure between the studied low-virulence isolates and virulent strains. These methods showed that low-virulence strains are widely distributed in the two major lineages, but some are also clustered according to their genetic mutations. These analyses showed that low-virulence strains initially grouped according to their lineage, then to their serotypes and after which, they lost their virulence suggesting a relatively recent emergence. Loss of virulence in lineage II strains was related to point mutation in a few virulence genes (*prfA*, *inlA*, *inlB*, *plcA*). These strains thus form a tightly clustered, monophyletic group with limited diversity. In contrast, low-virulence strains of lineage I were more dispersed among the virulence strains and the origin of their loss of virulence has not been identified yet, even if some strains exhibited different mutations in *prfA* or *inlA*.

Découverte de l'hypervirulence de Listeria monocytogenes pas l'étude de sa biodiversité

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

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. Nat Genet. 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.

3.1.5. 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.

En collaboration avec l'Université de Cornell, Food Science Department, le CNRL a étudié les espèces récemment publiées de *L. aquatica*, *L. floridensis*, *L. cornellensis*, *L. grandensis*, et *L. riparia* [27].

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.

3.1.6. Développement de nouveaux outils de diagnostic

Identification de Listeria par Maldi-Tof par la méthode Andromas

En collaboration avec le service de microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants Malades (O. Join-Lambert).

Article publié: Farfour, E., J. Leto, M. Barritault, C. Barberis, J. Meyer, B. Dauphin, A. S. Le Guern, A. Lefleche, E. Badell, N. Guiso, A. Leclercq, A. Le Monnier, M. Lecuit, V. Rodriguez-Nava, E. Bergeron, J. Raymond, S. Vimont, E. Bille, E. Carboneille, H. Guet-Revillet, H. Lecuyer, J. L. Beretti, C. Vay, P. Berche, A. Ferroni, X. Nassif, O. Join-Lambert. Evaluation of the Andromas MALDI-TOF MS system for identification of aerobically growing Gram-positive Bacilli. *J Clin Microbiol.* 50(8):2702-7.

Abstract: Matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a rapid and simple microbial identification method. Previous reports using the Biotyper system suggested that this technique requires a preliminary extraction step to identify Gram-positive rods (GPRs), a technical issue that may limit the routine use of this technique to identify pathogenic GPRs in the clinical setting. We tested the accuracy of the MALDI-TOF MS Andromas strategy to identify a set of 659 GPR isolates representing 16 bacterial genera and 72 species by the direct colony method. This bacterial collection included 40 *C. diphtheriae*, 13 *C. pseudotuberculosis*, 19 *C. ulcerans*, and 270 other *Corynebacterium* isolates, 32 *L. monocytogenes* and 24 other *Listeria* isolates, 46 *Nocardia*, 75 *Actinomyces*, 18 *Actinobaculum*, 11 *Propionibacterium acnes*, 18 *Propionibacterium avidum*, 30 *Lactobacillus*, 21 *Bacillus*, 2 *Rhodococcus equi*, 2 *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and 38 other GPR isolates, all identified by reference techniques. Totals of 98.5% and 1.2% of non-*Listeria* GPR isolates were identified to the species or genus level, respectively. Except for *L. grayi* isolates that were identified to the species level, all other *Listeria* isolates were identified to the genus level because of highly similar spectra. These data demonstrate that rapid identification of pathogenic GPRs can be obtained without an extraction step by MALDI-TOF mass spectrometry.

Identification de *Listeria* par Maldi-Tof par la méthode Bruker

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

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.

Détection de tronctions dans *InlA* par immunofluorescence indirecte

Un grand nombre d'isolats du CNRL préalablement typés par MLST et pour lesquelles l'intégralité du gène *inlA* a été séquencé ont été étudiées avec une méthode d'immunofluorescence indirecte (IFI), permettant de détecter *InlA*. Si les souches expriment une *InlA* tronquée, non-fonctionnelle pour l'entrée et donc associée à une hypovirulence, l'IFI sera négative. Une validation de ce test par comparaison avec les résultats de séquençage du gène *inlA* a été achevée. Une optimisation du choix des anticorps monoclonaux à utiliser a été réalisée. Cet outil a permis de caractériser des souches de gastroentérites étudiées au CNRL. Les résultats de cette étude vont aboutir à une méthode simple permettant de prédire la production d'une *InlA* tronquée ou complète.

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

Développement d'un schéma de référence de multilocus variable-number of tandem repeats analysis (MLVA) pour *Lm*

En collaboration avec S. Brisse (Institut Pasteur) et C. Pourcel (Institut de génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud, Orsay).

Article publié : V. Chenal-Francisque, L. Diancourt, T. Cantinelli, V. Passet, C. Tran-Hykes, H. Bracq-Dieye, A. Leclercq, C. Pourcel, M. Lecuit, and S. Brisse. Optimized Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Assay and Its Complementarity with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing for *Listeria monocytogenes* Clone Identification and Surveillance. *J Clin Microbiol* 51:1868-80.

Abstract: Populations of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* are genetically structured into a small number of major clonal groups, some of which have been implicated in multiple outbreaks. The goal of this study was to develop and evaluate an optimized multilocus variable number of tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) subtyping scheme for strain discrimination and clonal group identification. We evaluated 18 VNTR loci and combined the 11 best ones into two multiplexed PCR assays (MLVA-11). A collection of 255 isolates representing the diversity of clonal groups within phylogenetic lineages 1 and 2, including representatives of epidemic clones, were analyzed by MLVA-

11, multilocus sequence typing (MLST) and pulse field gel electrophoresis (PFGE). MLVA-11 was less discriminatory than PFGE, except for some clones, and was unable to distinguish some epidemiologically unrelated isolates. Yet it distinguished all major MLST clones and therefore constitutes a rapid method to identify epidemiologically relevant clonal groups. Given its high reproducibility and high-throughput, MLVA represents a very attractive first-line screening method to alleviate PFGE workload in outbreak investigations and listeriosis surveillance

Genotypage par Multi-virulence-locus sequence typing (MvLST)

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

*Publication : T. [Cantinelli](#), V. [Chenal-Francisque](#), L. Diancourt, L. Frezal, A. [Leclercq](#), T. Wirth, M. [Lecuit](#), and S. Brisse. 2013. "Epidemic Clones" of *Listeria monocytogenes* Are Widespread and Ancient Clonal Groups. J Clin Microbiol. 51(1):3770-9.*

Abstract: The food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* is genetically heterogeneous. Although some clonal groups have been implicated in multiple outbreaks, there is currently no consensus on how "epidemic clones" should be defined. The objectives of this work were to compare the patterns of sequence diversity on two sets of genes that have been widely used to define *L. monocytogenes* clonal groups: multilocus sequence typing (MLST) and multi-virulence-locus sequence typing (MvLST). Further, we evaluated the diversity within clonal groups by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Based on 125 isolates of diverse temporal, geographical, and source origins, MLST and MvLST genes (i) had similar patterns of sequence polymorphisms, recombination, and selection, (ii) provided concordant phylogenetic clustering, and (iii) had similar discriminatory power, which was not improved when we combined both data sets. Inclusion of representative strains of previous outbreaks demonstrated the correspondence of epidemic clones with previously recognized MLST clonal complexes. PFGE analysis demonstrated heterogeneity within major clones, most of which were isolated decades before their involvement in outbreaks. We conclude that the "epidemic clone" denominations represent a redundant but largely incomplete nomenclature system for MLST-defined clones, which must be regarded as successful genetic groups that are widely distributed across time and space.

Amélioration de la surveillance de la listériose par l'ajout de *SmaI* au sous-typage PFGE *Ascl/ApaI* de *Lm*

*Poster A. [Leclercq](#), V. [cadet-Daniel](#), H. [Dieye](#), A. [Morvan](#), T. [Cantinelli](#), V. [Chenal-Francisque](#), and M. [lecuit](#). Improvment of listeriosis surveillance by adding *SmaI* to *Listeria monocytogenes Ascl/ApaI* PFGE subtyping. ISOPOL, GOA (Inde), 2013. Abstract P/DS/12 page 90.*

Abstract: Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) is the reference method for detecting and investigating clusters of human cases or outbreaks of listeriosis. Even if there is a standardized Pulsenet PFGE protocol based on the utilization of the restriction endonucleases *Ascl* and *ApaI*, PFGE results are sometimes not sufficient to investigate clusters of human cases or outbreaks caused by endemic isolates. In order to increase the discriminatory power of PFGE, a third restriction endonuclease, *SmaI*, can be used. We present here our latest developments of the *SmaI* PFGE protocol. *SmaI* PFGE parameters have been adapted and optimized, and reference strains for *Lm* serotypes, the main strains from French outbreaks and 900 isolates from human, food and environmental origins have been typed with *SmaI* PFGE. As for PFGE with *Ascl* and *ApaI*, *SmaI* clusters isolates of the same serotypes. The addition of *SmaI* increases the discriminative power obtained with the combination of *Ascl* and *ApaI* and is useful for the epidemiological surveillance of isolates of endemic *Ascl/ApaI* combined profiles. This was illustrated in the investigation of the recent 2012 French outbreak due to an endemic profile that we successfully investigated with *SmaI* PFGE subtyping.

PCR multiplexe pour identifier les clones hypervirulents et hypovirulents de *Listeria monocytogenes*

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

Déclaration d'invention DI2015-13 Maury, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., Lavina, M., Touchon, M., Lecuit, M., Brisse, S. - Brevet EP 15306154.4-1404: *Listeria monocytogenes* clonogrouping and assessment of infectivity.

Article publié : Chenal-Francisque V., Maury M., Lavina M., Touchon M., Leclercq A., Lecuit M., Brisse S. 2015. Clonogrouping, a rapid multiplex PCR method to identify major clones of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol.* 53(10):3355-8.

Abstract: *Listeria monocytogenes* is genetically heterogeneous and is subdivided into lineages, PCR serogroups and MLST clonal complexes (CCs, or clones). A limited number of major clones were identified, among which CC1, CC2, CC4 and CC6 are hypervirulent and represent almost half of the strains involved in clinical infections, whereas CC9 and CC121 are hypovirulent and represent more than 40% of the strains isolated from food samples (Maury, Tsai et al., 2016). In the context of epidemiological surveillance of listeriosis as well as for food and clinical microbiology, rapid identification of clones is critical. We therefore developed three multiplex PCR assays, each targeting clones of a particular PCR serogroup (IVb, IIb and IIa/IIc) to identify the most frequent clones in clinical and food samples (CC1, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, CC121 and CC155). This novel tool is intended to be used in a two-step strategy: first, use of the PCR serogrouping method developed by Doumith et al. in 2004; second, depending on the determined PCR serogroup, use of the appropriate clonogrouping PCR assay (IVb, IIb or IIa, IIc) for identification of the MLST clone. This strategy can provide clone identification in less than one day starting from a bacterial culture. By using this method, 270 out of 282 (95.7%) tested strains of serogroups IVb, IIb, IIa and IIc were accurately identified at clone level. This widely applicable tool is therefore a rapid and efficient alternative to MLST for identification of hypervirulent and hypovirulent clones of *L. monocytogenes*. It will significantly refine the genotypic characterization of *L. monocytogenes* strains as compared to the PCR serogrouping method and will provide rapid information to risk managers during the investigations of outbreaks.

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

Présentation Orale, Journées des CNRs, S. Brisse : *Genomic Epidemiology of bacterial pathogens*.

Article in press : 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 Microbiol*, in press.

Abstract: *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a major human foodborne pathogen. Numerous *Lm* outbreaks have been reported worldwide, associated with 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) and that major sublineages (corresponding to so-called 'epidemic clones') are estimated to be at least 50 to 150 years old. This work demonstrates the urgent need of monitoring *Lm* strains at the global level and provides the unified approach needed for global harmonization of *Lm* genome-based typing and population biology.

Surveillance génomique de *Listeria monocytogenes* en 2015 en France

En collaboration avec S. Brisse, Unité de génomique évolutive des microbes, Institut Pasteur, et M. Tourdjman, H. De Valk (INVS/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. Manuscrit en cours de rédaction. (cf. annexe*

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.

Distribution mondiale des clones majeurs de *Listeria monocytogenes*

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

*Article publié: Chenal-Francisque, V., Lopez, J., Cantinelli, T., Caro, V., Tran, C., Leclercq, A., Lecuit, M., Brisse, S. 2011. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis.* 17:1110-2.*

Abstract: *Listeria monocytogenes* is a worldwide pathogen, but the geographic distribution of clones remains largely unknown. Genotyping of 300 isolates from the 5 continents and diverse sources showed the existence of few prevalent and globally distributed clones, some of which include previously described epidemic clones. Cosmopolitan distribution indicates the need for genotyping standardization.

Biodiversité des clones majeurs de *L. monocytogenes* d'origine alimentaire

Financement Institut Pasteur ANSES

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

*Poster Roussel, S., V. Chenal-Francisque, G. Pontdeme, M. Lecuit, S. Brisse, A. Brisabois. Genetic diversity of major clones of *Listeria monocytogenes* from food sources. ISOPOL, Goa (Inde), 2013. Abstract P/DS/08 page 86.*

Abstract: To help epidemiological investigation and to define clones (groups of genetically similar isolates descending from a common ancestor), different molecular methods, especially PFGE and MLST, have been used. Recent studies indicated that a few clones were responsible for a majority of past outbreaks of listeriosis in France. However, only few data on the genetic diversity of food strains in France are available.

The objective was to analyse the diversity of clones according to the food sources, over ten years, between 2000 and 2010. The genetic diversity of strains included in the database of the French National Reference Laboratory (NRL) was analyzed. A panel of 135 isolates, representative of the frequent serogroups and PFGE types of the NRL database, was typed by MLST in order to delineate prevalent *LM* clones. MLST separated the strains into 45 different STs (Sequence Types) and 22 CCs (Clonal Complexes). The STs were specifically associated to each serogroup with a few exceptions.

The most frequent clones observed here corresponded to major clones previously described (CC5, CC6: Lineage I; CC121, CC9: Lineage II). Our results show that these clones were not associated to a given food source. The STs and CCs correlated with the PFGE types, suggesting the possible set up of a dictionary between MLST and PFGE. This study revealed also that the CC121 appeared to be frequently detected in food.

The confirmation of these preliminary results and the analysis of the whole genome of food strains of CC121 are in process and should contribute to evaluate the risk presented by this CC for public health. In the next months, we intend to assess the prevalence of CC121 strains in Europe, through the use of the molecular typing database of the European Union Reference Laboratory LM (EURL LM DB).

La nature ubiquitaire des clones de L. monocytogenes : étude MLST à grande échelle

En collaboration avec l'Environmental Research Institute and Department of Microbiology, University College Cork, Ireland (J. Haase and M. Achtman)

Article publié: Haase, J. K., X. Didelot, M. Lecuit, H. Korkeala, L. monocytogenes MLST study group (A. Leclercq, K. Grant, M. Wiedmann, Petra Apfalter), M. Achtman. 2013. The ubiquitous nature of Listeria monocytogenes clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study. Environ Microbiol. 16(2):405-16.

Abstract: We used MultiLocus Sequence Typing (MLST) of ~2,000 isolates of *L. monocytogenes* to investigate whether specific associations existed between clonal complexes (CCs) and the environment *versus* diseased host. Most CCs (72%) were not specific for any single source, and many have been isolated from the environment, food products, animals as well as from humans. Our results confirm that the population structure of *Lm* is largely clonal, and consists of four lineages (I-IV), three of which contain multiple CCs. Most CCs have remained stable for decades but one epidemic clone (CC101) was common in the mid-1950's and very rare until recently when it may have begun to re-emerge. The historical perspective used here indicates that the central sequence types of CCs were not ancestral founders but have rather simply increased in frequency over decades.

3.1.8. Etude de la résistance aux antibiotiques

Traitement de la listériose pendant la grossesse : leçons à propos de 4 cas

En collaboration avec F. Goffinet (Hôpital Cochin Port Royal, Service d'obstétrique) et E. Azria (Hôpital Bichat Claude Bernard, Gynécologie-Obstétrique).

Article : Charlier, C., Goffinet, F., Azria, E., Leclercq, A., M. Lecuit. Antimicrobial therapy for listeriosis during pregnancy: lessons from four case-reports. Clin Microbiol Infect 20(3):246-9.

Abstract: *Listeria monocytogenes* infection during pregnancy can lead to dramatic fetal or neonatal outcomes. No clinical trial has evaluated treatment options, and retrospective studies of cases are therefore important to define optimal regimens. We report four cases of materno-neonatal listeriosis illustrating inadequate antimicrobial therapy management and discuss recommended treatment options.

Caractérisation d'un isolat clinique de Lm résistant à la rifampicine

En collaboration avec P. Courvalin et S. Mehvish (Unité des Agents antimicrobiens)

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

Abstract: Antibiotic resistance is exceptional in *Lm*, which is sensitive to most clinically relevant antibiotics. Here, we report the first characterization of a human clinical isolate highly resistant to rifampin. The *rpoB* gene which encodes the RNA polymerase subunit Beta, exhibits a missense mutation in a conserved domain previously shown to be associated with rifampin resistance.

3.2. Le conseil aux professionnels ou aux autorités compétentes

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 afin de les renseigner et les sensibiliser au danger représenté par *Lm*.

3.2.1. Centre de documentation et publication avec les laboratoires correspondants

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

3.2.2. Site Internet

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

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

Ce site contient des informations sur les missions du CNRL, son activité et ses rapports d'activité, la maladie, des recommandations (Professionnels de santé, laboratoires, opérateurs agro-alimentaires, patients), des liens avec 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).

3.2.3. 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.

3.2.4. 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 organisée 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 4).

De 2011 à 2015, le CNRL a accueilli des étudiants, stagiaires ou chercheurs:

- Carlos SOTO ALVAREZ (Janvier - Juin 2011), Stage M2, Master Sciences et Technologie, Mention Biologie moléculaire et cellulaire, Université Paris 6, « **Diversité génétique et potentiel de virulence des souches de *L. monocytogenes*** ».
- Leila BOUAYAD (Janvier - Février 2013), Inspectrice Vétérinaire, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, Algérie, stage sur « **Identification et caractérisation de *L. monocytogenes* isolées de viandes de volailles en Algérie** ».
- Axelle GAZZANO (Mai - Juillet 2015), Stage de 1^{er} Année BTS Anabiotec : Analyses biologiques et biotechnologies du lycée technique privé « Les Mandailles » dont le projet s'intitulait « **Initiation à la microbiologie, aux activités de références dans un CNR et au génotypage** ».

- Dr. Alexandra MOURA (depuis 2014), chercheur post-doctorante dont le projet s'intitule « **Génomique des populations des souches de *Listeria monocytogenes*** ».
- Pour l'étude Monalisa, le CNRL a accueilli les différents techniciens d'études cliniques suivants : Magatte FALL (Septembre 2013 – Novembre 2015), Kelly CHEUNG (2011- Juillet 2013), Camille LEVALOIS (2011- Juillet 2013), Thierry CACHINA (2011- Juillet 2013).

3.2.5. Participation à la rédaction de communications écrites didactiques

Le CNRL a participé à l'élaboration des chapitres de livres ou de revues didactiques listés dans la partie 4.6 pour les professionnels de santé et de l'agro-alimentaire.

En 2011-2012, le CNRL a également été corédacteur de la fiche ANSES sur *Lm* (www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-Listeria.pdf).

3.2.6. Activité de conseil

De 2011 à 2015, le CNRL a reçu en moyenne 200 demandes d'information par e-mail (listeria@pasteur.fr) (~4/semaine) et environ 300 appels téléphoniques (~5/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).

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. Cette étude favorise nos échanges avec les professionnels de santé, qui n'hésitent pas à nous signaler directement des observations cliniques ou microbiologiques atypiques.

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)
- 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

3.2.7. Expertises

Expertises de souches

De 2011 à 2015, le CNRL a reçu 682 souches isolées de patients ou d'aliments qui lui étaient adressées par des laboratoires de pays étrangers pour expertise.

Le CNRL a également reçu 897 souches d'origine environnementale et/ou alimentaire (279 en 2015) adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour leur identification et leur caractérisation dans un cadre de prestations privées 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

De 2011 à 2015, 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 DGAL.

Expertise de publications et de projets scientifiques

De 2011 à 2015, le CNRL a participé à l'examen de plus de 83 articles dans des journaux nationaux et internationaux à comités de lecture (Lancet Infectious Diseases, Proceedings of the Royal Society Biological Sciences, PloS Pathogens, Clinical Microbiology and Infection, Epidemiology and Infection, International Journal of Food Microbiology, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Foodborne Pathogens and Disease, Food Microbiology, Journal of Food Protection, J. Applied Microbiology, Eurosurveillance, Research in Microbiology, etc.). Il a également expertisé des projets scientifiques de type ANR, FranceAgrimer, européens EU FP7. 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 « Evaluation des risques biologiques des aliments » de l'ANSES.

Conseil auprès de Ministères

De par sa participation à la cellule *Listeria*, le CNRL est en contact avec les services concernés des Ministères de l'Économie, de l'Agriculture et de la Santé. Le CNRL contribue à la préparation d'avis de l'ANSES en participant à l'étude de saisines de l'ANSES. En 2012, A. Leclercq a participé aux groupes d'experts ANSES sur la saisine 2012-SA-0102 de la DGS (réévaluation des produits de la mer comme produits à risque pour les femmes enceintes). Un avis a été publié dans le guide PNNS intitulé « Le guide nutrition pendant et après la grossesse ».

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

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

3.2.8. Retour d'informations

Le retour d'information prend plusieurs formes :

1. La surveillance microbiologique de la listériose en France se fonde sur l'envoi volontaire et centralisé au CNRL de souches isolées de patients par les laboratoires médicaux, ainsi que l'envoi de souches non humaines par les laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments. Dans chaque cas, un compte-rendu détaillé des analyses effectuées pour chaque souche est envoyé au laboratoire expéditeur et, en cas d'atypies, le compte-rendu est accompagné d'articles scientifiques explicatifs. 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. L'activité de surveillance épidémiologique a conduit, à côté des publications à visée de recherche en langue anglaise, à la publication de différents articles plus didactiques en langue française en lien avec l'InVS : numéro hors-série du bulletin épidémiologique hebdomadaire [9, 28], synthèse sur la « listériose humaine : une zoonose d'origine alimentaire », qui a été publiée dans la Revue Francophone des Laboratoires [29].

3. L'activité de recherche clinique menée par le CNRL est présentée à de multiples congrès nationaux et internationaux (congrès mondial *Listeria* ISOPOL 2013 et 2016, congrès européen de Maladies Infectieuses en 2014, 2015 et 2016, réunion multidisciplinaire de chimiothérapie infectieuse (RICAI) en 2014).

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.

3.3. Contribution à la surveillance épidémiologique

Afin de faciliter la lecture de ce rapport, la description du système de surveillance français des Listeria et de la listériose ainsi que la définition des termes employés sont décrits en Annexe B.

3.3.1. Données de la surveillance microbiologique de la listériose humaine

3.3.1.1. Cas de listériose 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 ;
 - d'une **autre forme (A)**: définie par la présence de *Lm* dans un prélèvement non fécal extra-sanguin et extra-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. Le présent bilan concerne tous les cas pour lesquels un prélèvement positif à *L. monocytogenes* a été effectué entre 2011 et 2015 et la souche caractérisée par le CNRL. Ceci inclut donc des souches reçues au cours du premier trimestre 2016 compte tenu des délais d'acheminement des souches au CNRL.

Les données 2011-2014 sont synthétisées car elles ont été présentées dans les rapports d'activités antérieurs.

3.3.1.2. Analyse globale des cas de listériose

Nombre total de cas

Entre 2011-2015, le CNRL a reçu 1986 souches humaines (dont 459 en 2015) rattachées à 1790 suspicions d'infections humaines déclarées (dont 412 en 2015), dont 2 cas à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* en 2014 et 2015 et 1 cas à *L. seeligeri* en 2015. La différence observée entre nombres de souches et de cas est liée à l'existence de doublons, voire de triplicats de souches (n = 198, dont 48 en 2015) par patient, exclus de l'analyse finale.

Pour 20 souches humaines, le CNRL n'a pas confirmé le diagnostic de listériose puisqu'il s'agissait de souches n'appartenant pas au genre *Listeria* (ex : *Lactobacillus*, *Legionella*, *Bacillus circulans*). Pour 7 suspicions d'infections humaines déclarées, le classement en listériose a été infirmé par SPF et l'étude MONALISA car il ne s'agissait pas d'infection invasive.

De 2011 à 2015, 14 selles ont été expertisées (selles d'un patient ayant consommé un fromage contaminé par *Lm* ; investigation d'une possible infection nosocomiale et recherche de *Lm* dans le cadre des recommandations de transplantation de microbiote fécal). Trois selles étaient positives à *Lm* avec, dans un cas, une souche similaire à celle isolée dans le sang, et pour un autre cas, une souche similaire à celle isolée dans le LCR.

Dans la même période 2011-2015, un LCR et une selle de nouveaux-nés ont été expertisés dans le cadre d'enquêtes médico-légales. Les demandes d'analyses d'échantillons biologiques (LCR, PL, sang, sérum) adressés au CNRL dans le cadre de suspicions de listériose (dont le diagnostic de 1^{ère} intention) n'entrent pas dans le cahier des charges du CNRL. Ces échantillons ont donc été transférés au service de microbiologie de l'hôpital Necker-Enfants Malades, en accord avec SPF et en conformité avec l'arrêté de Juin 2016 définissant les CNRs [30].

De 2011 à 2015, le CNRL retient donc, au jour du traitement statistique de ce dossier de candidature et après recoupement avec les données de l'InVS, 1768 cas de listériose à *Lm* avec souches isolées, dont 2 cas de listériose à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* et un cas à *L. seeligeri*. Seize autres cas ont été identifiés sans que la souche associée ait été conservée par le laboratoire correspondant et n'ait pu être adressée au CNRL. Parmi ces 1768 cas, 1740 ont eu lieu en France métropolitaine et 28 dans les COM-DROM-TOM.

Pour l'année 2015, le CNRL retient 405 cas de listériose à *Lm*, dont un cas de listériose à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* et un cas à *L. seeligeri* au jour du traitement statistique de ce dossier de candidature (SPF retient 5 cas supplémentaires en 2015, sans souche associée à la DO): 402 en France métropolitaine et 3 dans les COM-DROM-TOM en 2015.

⇒ Les cas de listériose à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* en 2014-2015 et de *L. seeligeri* en 2015 ont été comptabilisés, en accord entre SPF et l'ARS concernée, même si la DO *Listeria* correspond *stricto sensu* à un isolement de *Lm* à partir d'un site normalement stérile. En effet, les cas de listériose humaine invasive à *L. ivanovii* ou *L. seeligeri* étant rares, il était important qu'elles soient colligées et ainsi prises en compte dans la surveillance des listérioses.

⇒ En 2013, un cas de listériose cutanée a été rapporté, par isolement de *Lm* de papules sur le visage d'une femme ayant utilisé des crèmes de soins fabriquées avec des substances naturelles.

Taux d'exhaustivité

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

Une exhaustivité optimale est possible grâce :

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

De 2011 à 2015, le taux d'exhaustivité de réception des souches par rapport à l'ensemble des cas recensés a été de 99%, valeur qui est stable depuis 2000 (2015 et 2014 : 98,7% ; 2013 : 99,2% ; 2012 : 99,4% ; 2011 : 100%) (Figure 7). La non-récupération de souches par le CNRL résulte de souches non gardées ou non envoyées par les LABM. Par rapport aux autres systèmes de surveillance européens de la listériose, la France présente l'un des taux d'exhaustivité les plus élevés, ce qui rend possible des analyses épidémiologiques et microbiologiques fiables de qualité.

Laboratoires expéditeurs

De 2011 à 2015, les laboratoires expéditeurs sont à 84% hospitaliers (82% en 2015), reflétant la sévérité habituelle de l'infection. Les autres structures sont des laboratoires privés (16% de 2011 à 2015 ; 18% en 2015). Cette répartition est stable depuis 2011 pour la France métropolitaine et les DOM-TOM-COM.

La détermination de l'espèce *Lm* par les LABM est à 99,8% correcte (100% en 2015). Trois LABM ayant identifié des souches de *L. ivanovii* et de *L. seeligeri* ont fait parvenir les souches en question au CNRL.

L'utilisation croissante de la méthode de spectrométrie de masse (MS) MALDI-TOF dans les LABM hospitaliers a conduit le CNRL en 2015 à étendre l'utilisation de cette méthode pour l'identification des souches de *Listeria* au niveau du genre et de l'espèce. En 2012, le CNRL avait participé à une étude démontrant la fiabilité de cette méthode pour l'identification du genre *Listeria* avec le système ANDROMAS [31]. En 2015, le CNRL a validé la méthode avec le système Bruker 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. L'utilisation de cette méthode rapide nous permet de réduire le temps des analyses par rapport aux galeries Api-*Listeria*.

- Entre 2011 et 2015, le **délai moyen entre la date de prélèvement de la souche et la date de réception** au CNRL était de 10 jours avec 9,5 jours en 2015 (Figure 5). La réduction de ce délai est un objectif du CNRL et nécessite des relances des laboratoires par SPF et les ARS. Un service de collecte des souches humaines vers les CNRs de l'Institut Pasteur a été développé par un grand transporteur national, cependant tous les laboratoires d'analyses français n'utilisent pas les services de ce transporteur, expliquant la variabilité des délais d'acheminement.

- Entre 2011 et 2015, le **délai moyen entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai** (incluant l'identification à l'espèce et le groupage PCR de la souche) a été de 6,8 jours (6,4 j en 2015) (Figure 6). Le délai cible du système qualité du CNRL est de 6 jours. Conformément aux conditions analytiques du CNRL, ce délai peut s'allonger si les souches nous parviennent après le mercredi, ce qui décale la date d'obtention des résultats à la semaine suivante (+4 jours). Ce délai peut également s'allonger en cas de nécessité de purification de la souche ou de lecture sur 5 jours de l'hydrolyse des sucres en cas de tests phénotypiques complémentaires. Les délais non-conformes ont été liés à des rapports révisés (erreurs sur la lecture des renseignements manuscrits) ou à des difficultés techniques sur la détermination de l'utilisation de sucres lors de l'utilisation des galeries Api.

L'ensemble de ces résultats illustre la qualité du réseau de microbiologistes en lien avec le CNRL et la contribution essentielle des microbiologistes médicaux à la surveillance microbiologique de la listériose, qui soulignent cependant le problème du coût de l'envoi des souches au CNRL.

Figure 5. Distribution du délai entre le prélèvement et la réception au CNRL pour les souches d'origine humaine isolées entre 2011 et 2015 (médiane en rouge)

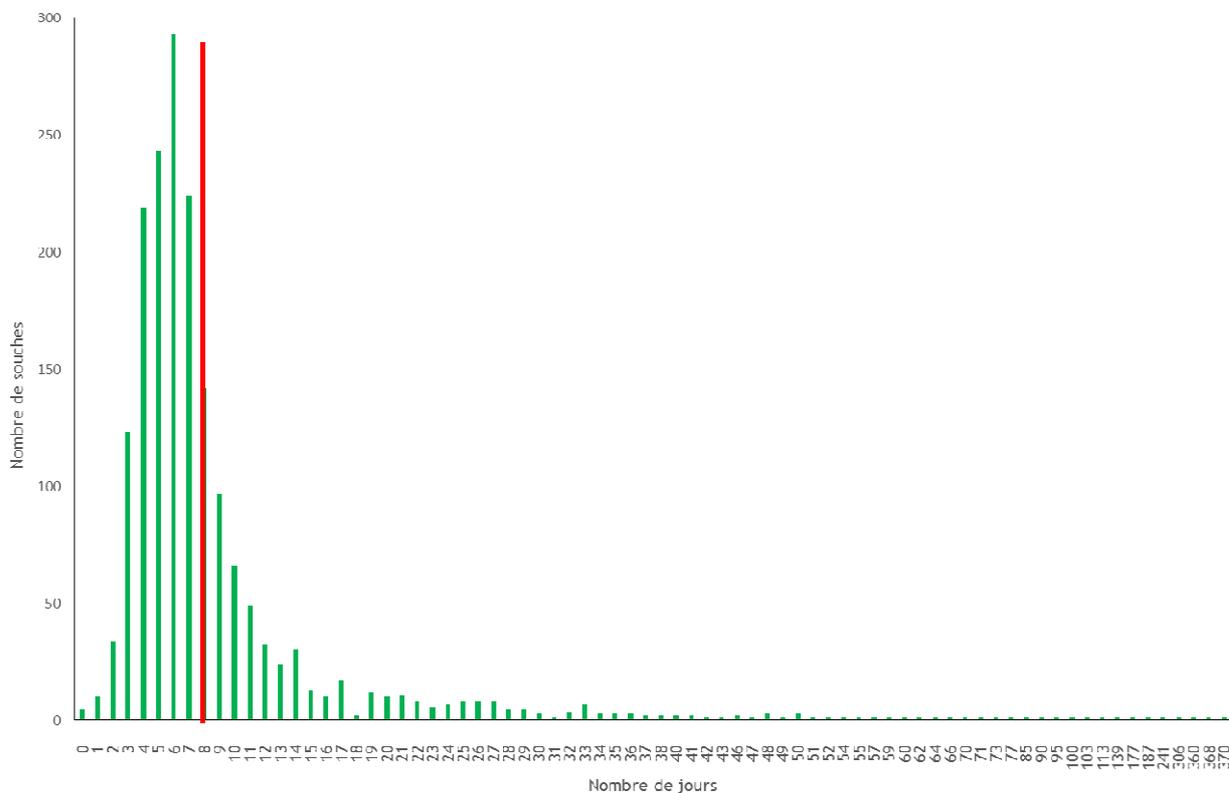
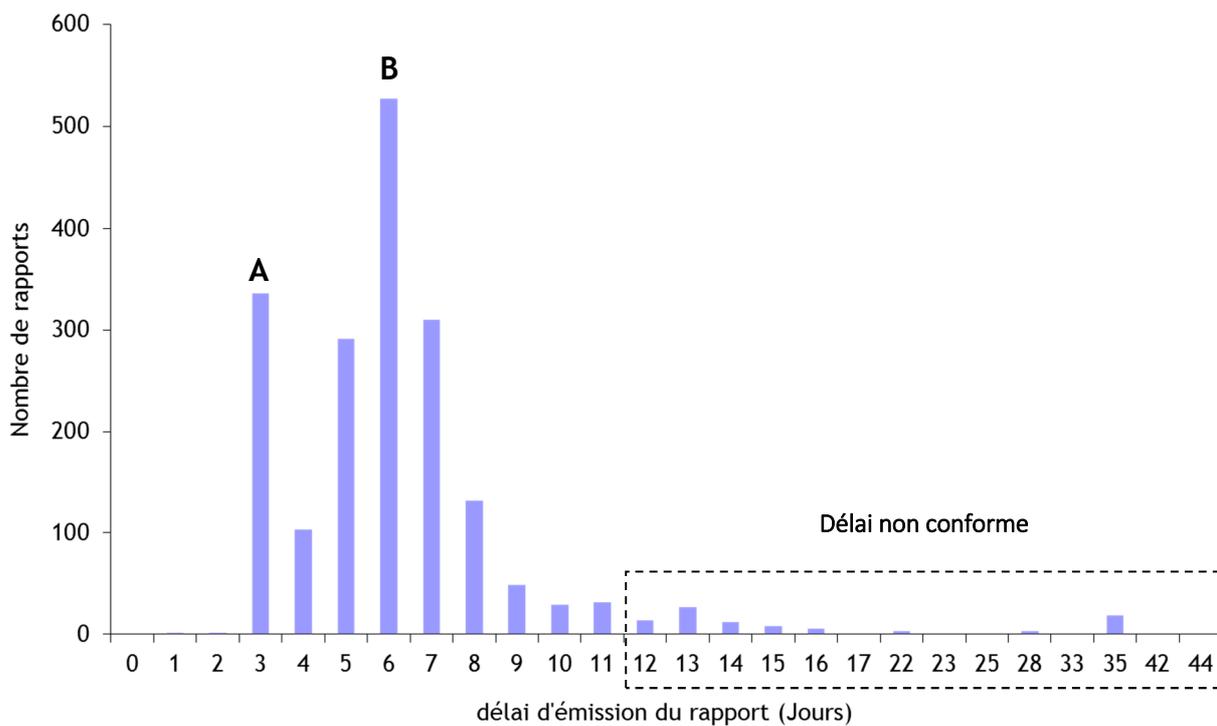


Figure 6. Distribution du délai entre la réception de la souche au CNRL et l'envoi du rapport d'essai pour les souches humaines isolées entre 2011 et 2015 (A, pic des rapports d'analyses sans week-end ; B, pic des rapports d'analyses avec week-end et/ou jours fériés).



3.3.1.3. Cas de listériose en France métropolitaine

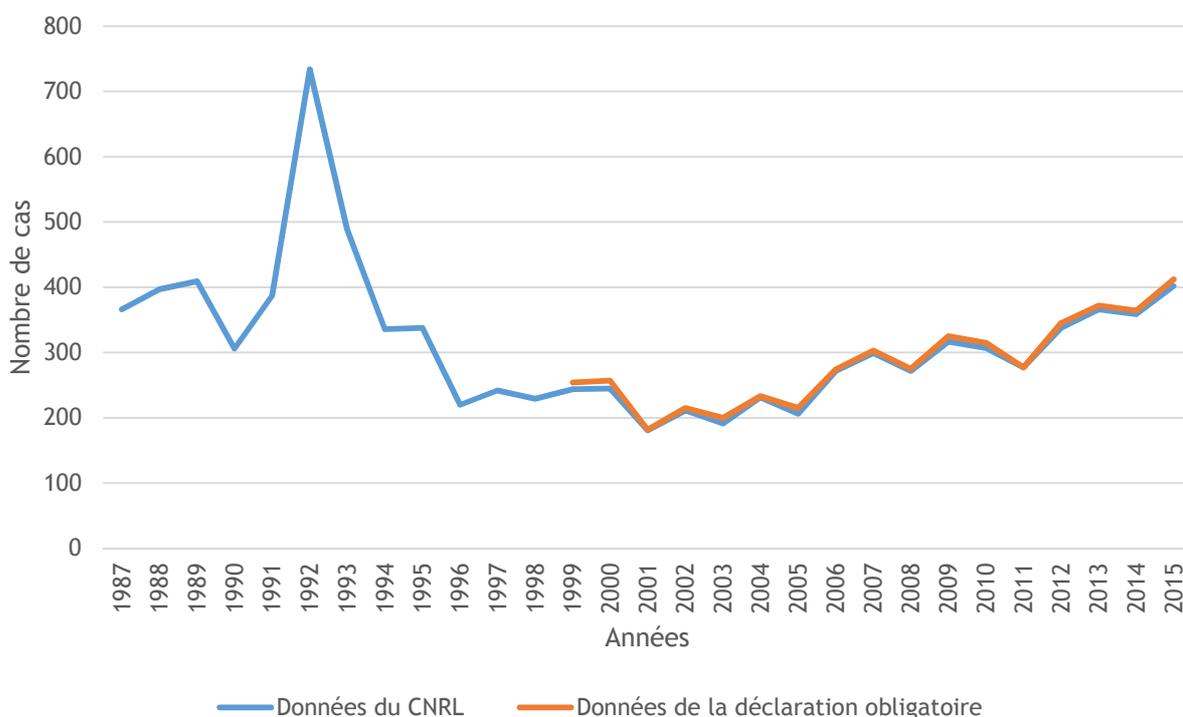
Entre 2011 et 2015, le nombre de cas de listériose ayant eu lieu en France métropolitaine était de 1740. Les cas de *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* et *L. seeligeri* ne sont pas pris en compte dans la suite de cette analyse.

Le nombre de cas de listériose en France métropolitaine en 2015 était de 402, soit une augmentation de 12% par rapport à 2014.

L'incidence de la listériose depuis 1992 a suivi différentes phases, observée dans tous les pays européens :

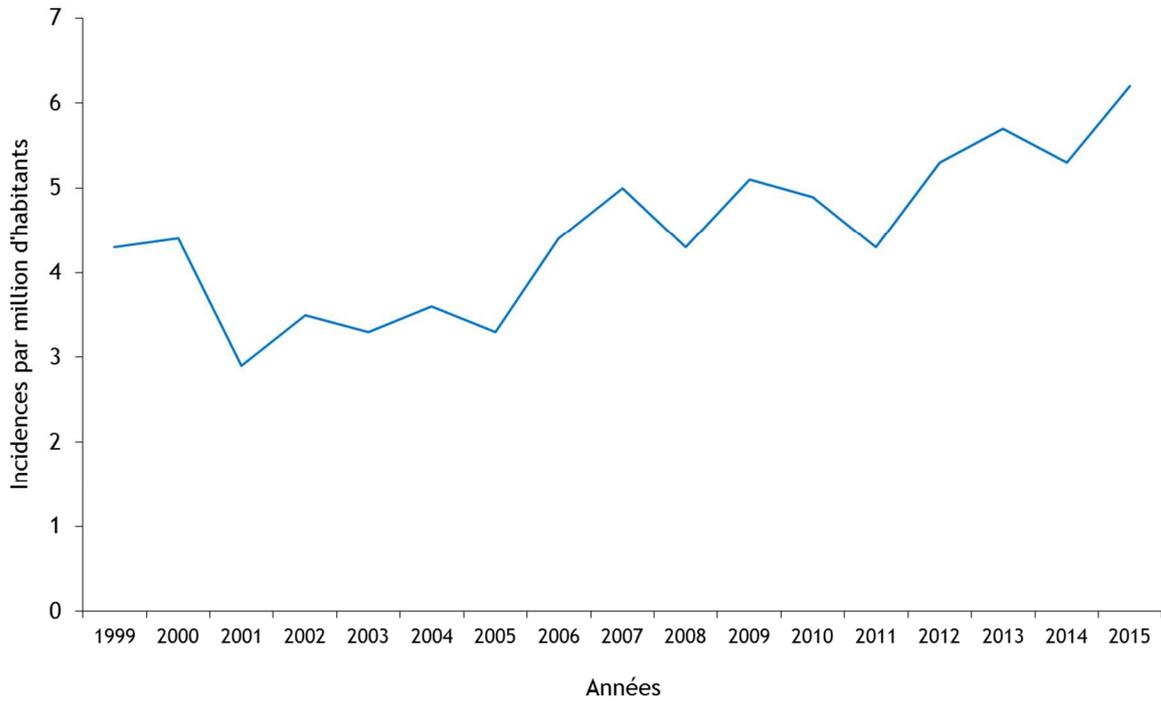
- Diminution importante dans les années 1990 de 700 à environ 400 cas par an
- Augmentation progressive depuis 2006 sans cause unique identifiée (ni dans le profil des souches, des niveaux de contaminations alimentaires ou du profil des patients) (Figure 7) [7].

Figure 7. Nombre de cas recensés en France métropolitaine par le CNRL et par la Déclaration obligatoire (Source : SPF) entre 1987 et 2015



L'incidence de la listériose humaine était de 6,2 cas par million d'habitants en 2015 : Cette incidence correspond à la valeur la plus élevée observée depuis la mise en place du système de surveillance français (la valeur précédente la plus élevée observée était de 5,3 en 2013) (Figure 8).

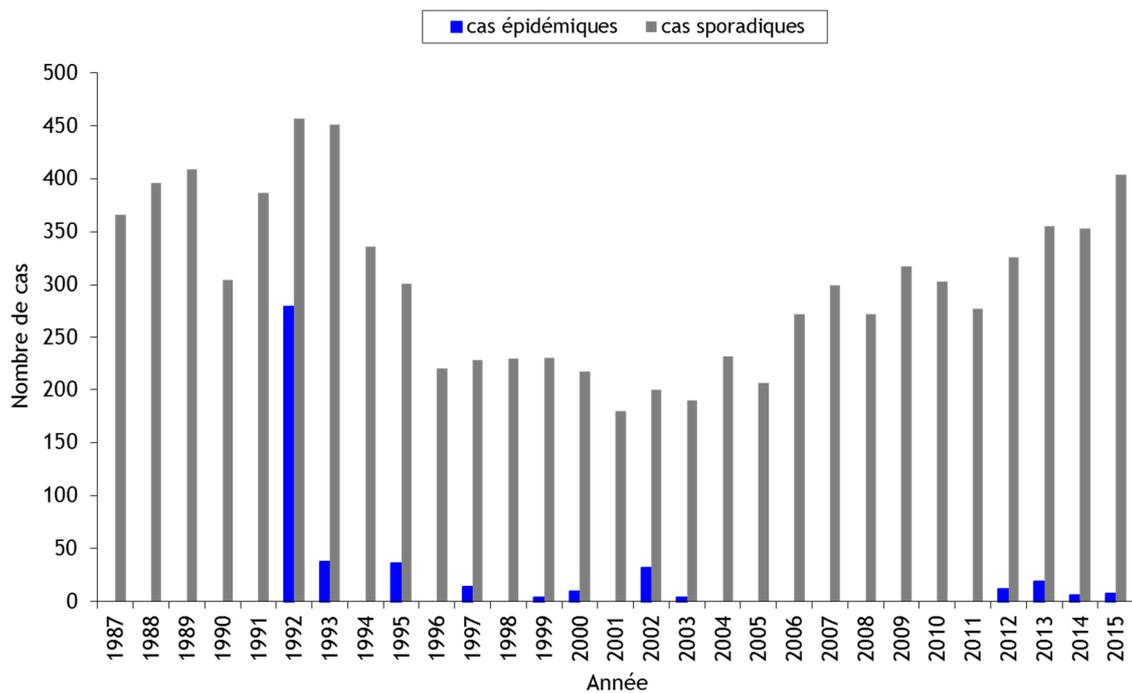
Figure 8. Incidence de 1999 à 2015 en France



L'évolution de la proportion de cas sporadiques et épidémiques est détaillée dans la Figure 9.

En 2015, cinq épidémies ont été recensées, sans aucune toxi-infection alimentaire. Une épidémie a été identifiée rétrospectivement grâce au typage génomique. Une augmentation du nombre d'épidémies est constatée à partir de 2012.

Figure 9. Nombre annuel de cas épidémiques et sporadiques de listériose survenus en France métropolitaine depuis 1987



3.3.1.3.1. Distribution temporelle des cas

Le nombre mensuel de cas sporadiques observés pendant l'année 2015 et pour les années 2011 à 2015 sont présentées respectivement dans les Figures 10 et 11.

Il existe une tendance à l'augmentation du nombre des cas en Décembre-Janvier et pendant la période estivale (de Juin à Août) (Figure 11). Il existe donc une saisonnalité des cas de listériose en France, sans que les raisons n'en soient à ce jour clairement identifiées (type d'aliments consommés, modalités de conservation ?).

Figure 10. Nombre de cas sporadiques de listériose par mois en France métropolitaine en 2015

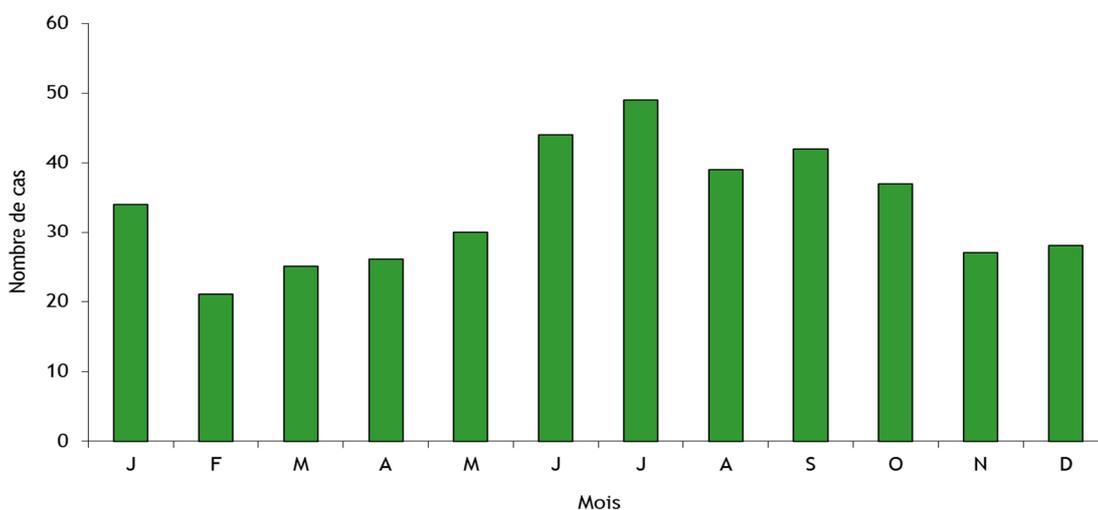
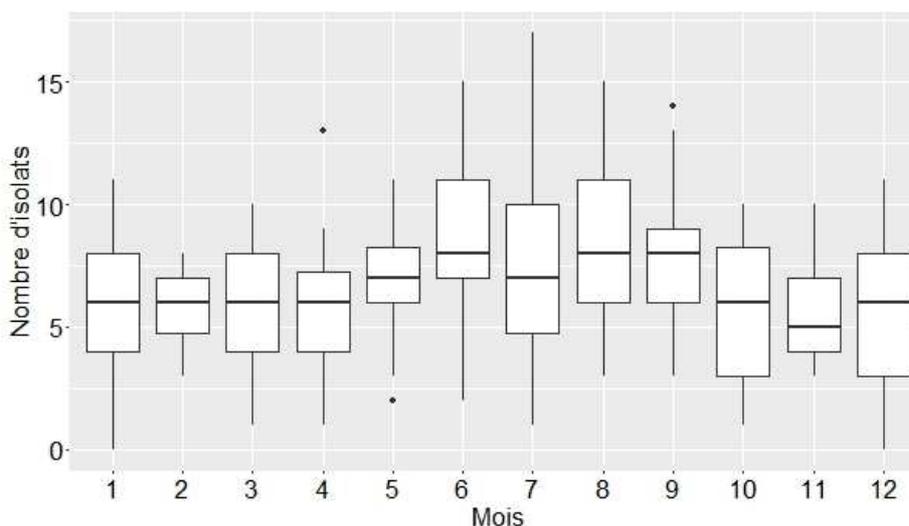
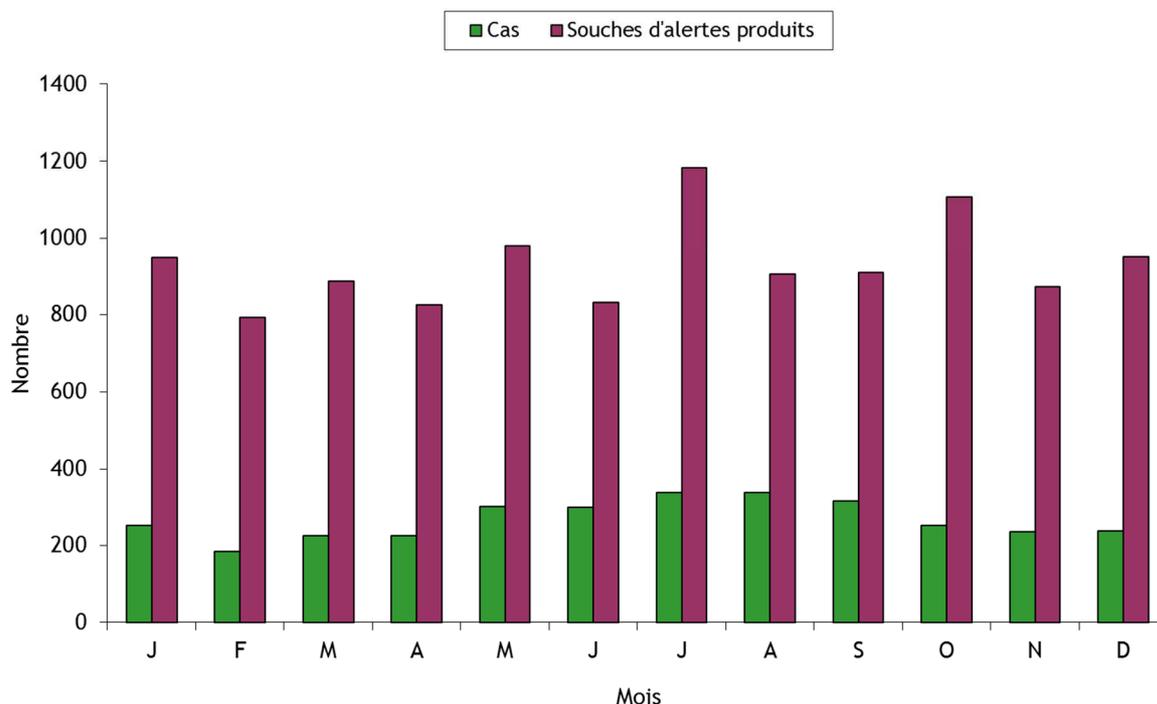


Figure 11. Nombre mensuel de cas sporadiques de listériose survenus en France métropolitaine de 2011 à 2015



Il ne semble pas exister de corrélation entre le nombre mensuel de souches d'alertes-produits et le nombre de cas (Figure 12).

Figure 12. Nombre de cas sporadiques de listériose et de souches alimentaires reçues dans le cadre d’alertes-produits en France métropolitaine de 2006 à 2015



3.3.1.3.2. Distribution géographique des cas

Les incidences régionales de la listériose sont présentées dans la Figure 13 pour l’année 2015 et dans la Figure 14 pour les années 2006 à 2015. Un récapitulatif chiffré est également présenté dans le Tableau 3. Les calculs d’incidence sont calculés à partir des chiffres de population de l’INSEE.

Les nouvelles régions françaises n’ont pas été implémentées en raison de leur définition récente.

Par région

- En 2015, les régions où les incidences ont été les plus élevées ($\geq 8,9$ cas / 10^6 habitants) étaient la Corse, la Bretagne, la Basse-Normandie, l’Auvergne et le Languedoc-Rousillon (Figure 13). L’incidence la plus faible (4,2 cas / 10^6 habitants) était constatée en Lorraine et Bourgogne.

- Entre 2011 et 2015, le Limousin (11,1 cas / 10^6 habitants) et la Champagne-Ardenne (9,8 cas / 10^6 habitants) était les 2 régions avec les incidences les plus élevées (Figure 14), tandis que le Nord Pas de Calais (5 cas / 10^6 habitants), et la Haute-Normandie (5 cas / 10^6 habitants) et la Lorraine (4,8 cas / 10^6 habitants) étaient celles avec les plus faibles incidences.

- Les incidences fluctuaient chaque année dans chaque région, sans qu’une tendance régionale stable ne se dégage entre 2011 et 2015.

Figure 13. Incidences régionales des cas de listériose survenus en 2015 (cas / 10⁶ habitants)

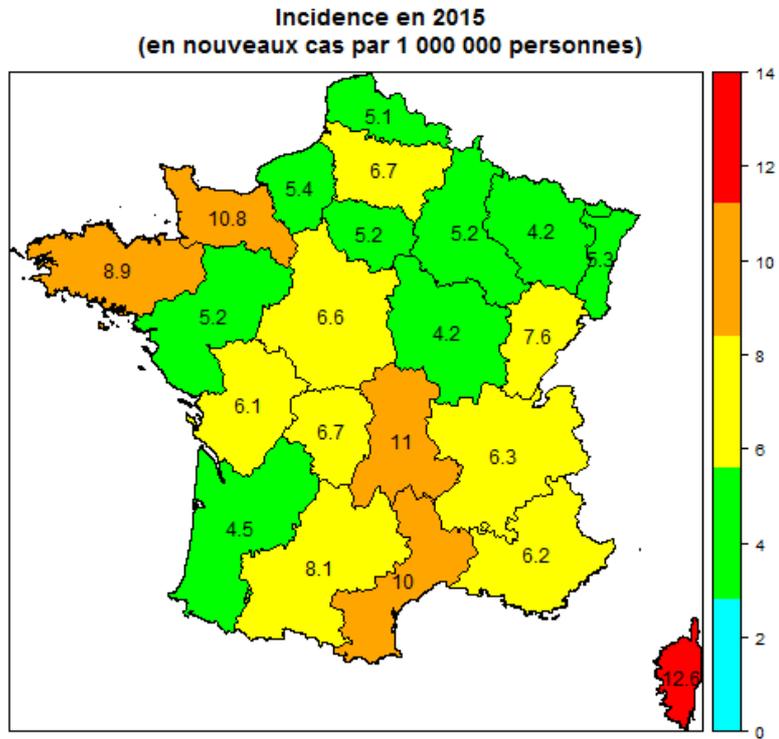


Figure 14. Incidences régionales annuelles moyennes des cas de listériose pour la période 2006-2015 (cas / 10⁶ habitants)

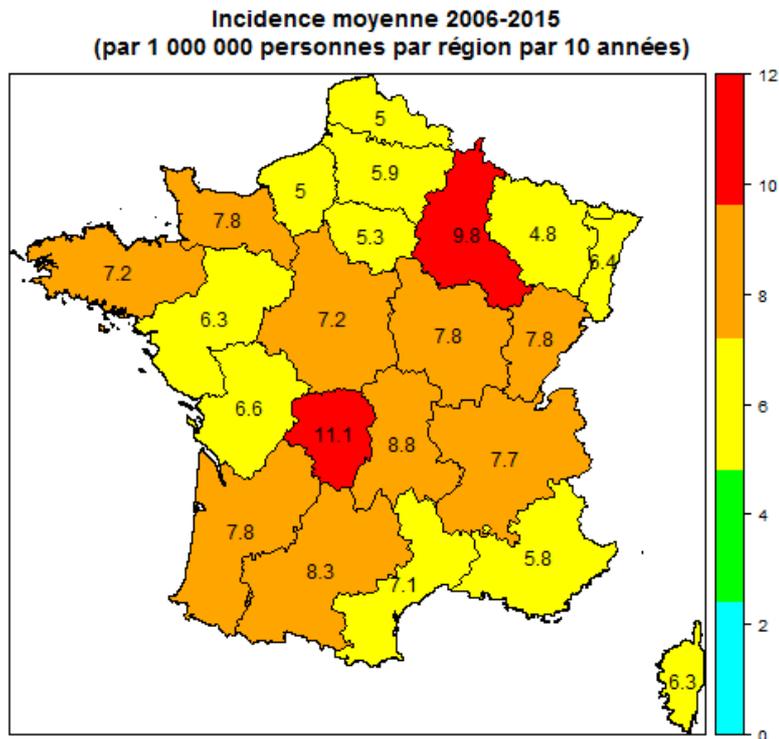


Tableau 3. Distribution régionale par an des cas sporadiques de listériose diagnostiqués en France métropolitaine depuis 2005

Région	Année										
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
ALSACE	7	8	12	12	7	8	7	9	12	15	10
AQUITAINE	13	16	32	20	19	20	20	25	13	21	15
AUVERGNE	1	6	8	5	8	5	10	8	6	9	15
BASSE-NORMANDIE	6	2	10	5	7	9	7	7	13	17	16
BOURGOGNE	5	9	7	7	10	10	7	10	8	11	7
BRETAGNE	13	16	15	14	15	20	19	23	20	15	29
CENTRE	7	11	8	7	16	13	10	24	17	12	17
CHAMPAGNE-ARDENNE	3	7	3	7	7	5	12	6	9	5	7
CORSE	2	4	3	0	0	1	1	3	2	2	4
FRANCHE-COMTE	4	2	1	1	6	5	8	4	5	10	9
HAUTE-NORMANDIE	5	7	4	6	10	9	1	6	13	7	10
ILE-DE-FRANCE	36	42	63	44	58	62	49	52	59	64	62
LANGUEDOC-ROUSSILLON	7	10	7	14	17	13	9	10	15	16	27
LIMOUSIN	1	2	6	2	4	6	4	7	2	9	5
LORRAINE	11	7	2	8	10	10	5	5	5	10	10
MIDI-PYRENEES	18	25	17	17	12	8	12	17	19	15	24
NORD-PAS-DE-CALAIS	15	11	21	12	15	17	21	24	29	18	21
PAYS DE LA LOIRE	9	11	4	11	9	11	14	14	25	26	19
PICARDIE	3	12	7	6	10	4	4	9	13	7	13
POITOU-CHARENTES	2	6	8	5	9	6	6	11	6	6	11
PROVENCE-ALPES-COTE-D'AZUR	16	31	19	18	25	15	23	20	26	20	31
RHONE-ALPES	18	26	42	47	43	41	28	45	46	44	40
Total	202	271	299	268	317	298	277	339	363	359	402

3.3.1.3.3. Distribution des cas selon la forme clinique

Formes materno-néonatales

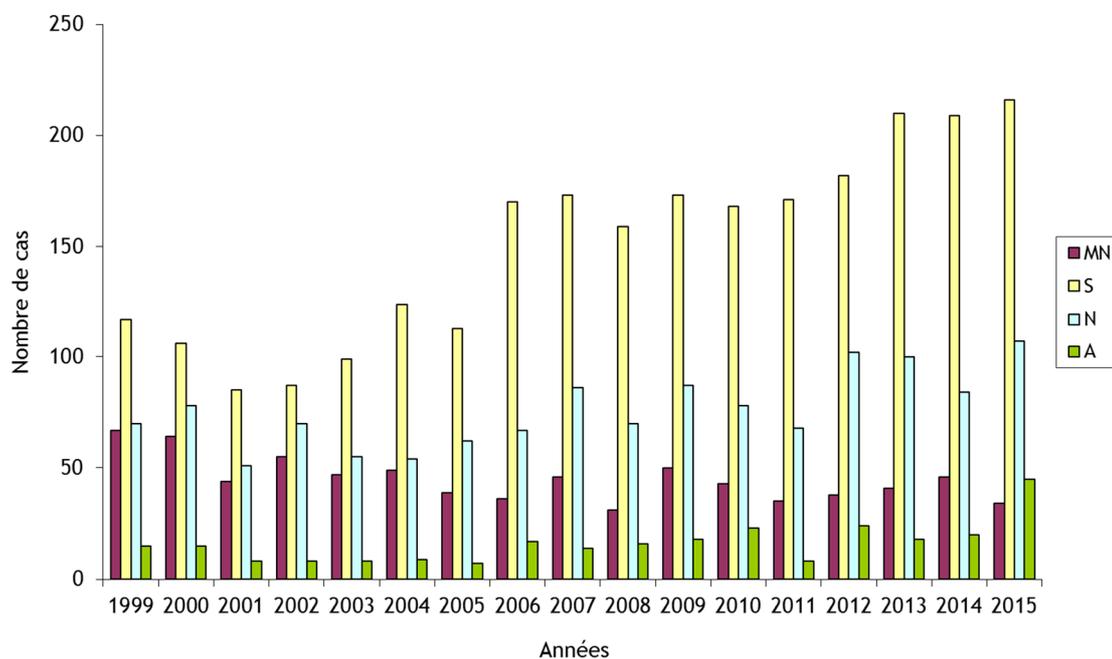
En 2015, 34 formes materno-néonatales ont été enregistrées, représentant 8 % du nombre total de cas sporadiques (Tableau 4), ce qui correspond au taux le plus faible enregistré depuis 2006.

De 1999 à 2015, leur nombre a diminué de 51% et s'est stabilisé depuis 2008 autour de 35 à 40 cas par an (représentant 8 à 15% du total des cas ; Figure 15). Cette diminution pourrait s'expliquer au moins en partie par les campagnes de recommandations alimentaires destinées aux femmes enceintes.

Tableau 4. Répartition des formes cliniques de 2006 à 2015

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Formes non materno-néonatales											
Septicémies	170 (71%)	180 (69%)	152 (63%)	170 (62%)	156 (61%)	180 (73%)	169 (56%)	207 (64%)	209 (67%)	216 (59%)	1809
Infections neurologiques	54 (22%)	69 (26%)	70 (29%)	85 (31%)	73 (29%)	57 (23%)	104 (35%)	98 (30%)	84 (27%)	107 (29%)	801
Autres formes	16 (7%)	12 (5%)	19 (4%)	19 (7%)	26 (10%)	9 (4%)	27 (9%)	18 (6%)	20 (6%)	45 (12%)	211
Total	240	261	241	274	255	246	300	323	313	368	2821
Formes materno-néonatales											
Total	31 (11%)	42 (14%)	27 (10%)	45 (14%)	43 (14%)	31 (11%)	38 (11%)	40 (11%)	46 (13%)	34 (8%)	377
Total des formes cliniques	271	303	268	319	298	277	338	363	359	402	3198

Figure 15. Nombre de cas sporadiques de listériose survenus en France métropolitaine depuis 1999 selon la forme clinique



La répartition mensuelle des cas diagnostiqués en 2015 est présentée dans la Figure 16. Le nombre de cas d'infections MN était compris entre 1 (en novembre et décembre) et 5 (en octobre) cas par mois.

Figure 16. Distribution mensuelle des cas sporadiques de listériose en France métropolitaine en 2015 selon la forme clinique

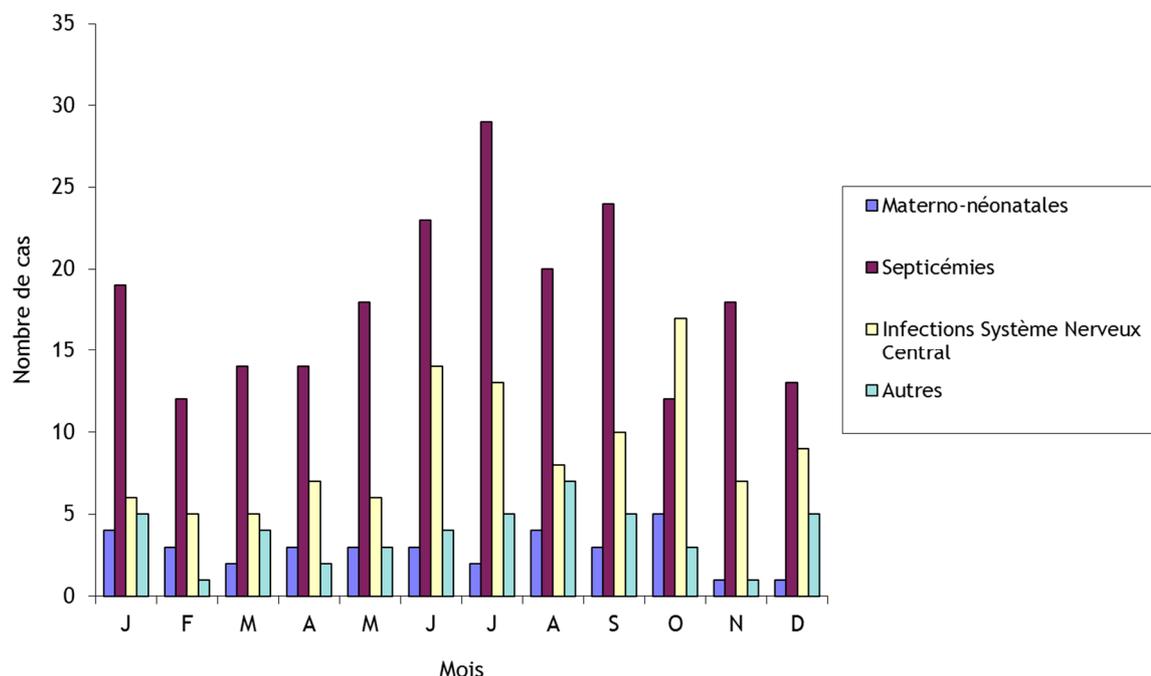


Tableau 5. Distribution régionale des cas sporadiques de listériose en France Métropolitaine en 2015 selon la forme clinique

Région	Total	Formes materno-néonatales	Septicémies	Infections du Système Nerveux Central	Autres
ALSACE	10	1	7	1	1
AQUITAINE	15	0	8	5	2
AUVERGNE	15	1	9	3	2
BASSE-NORMANDIE	16	0	7	6	3
BOURGOGNE	7	0	7	0	0
BRETAGNE	29	3	19	8	0
CENTRE	17	2	10	3	2
CHAMPAGNE-ARDENNE	7	0	3	2	2
CORSE	4	0	3	0	1
FRANCHE-COMTE	9	0	4	2	3
HAUTE-NORMANDIE	10	0	4	5	1
ILE-DE-FRANCE	62	11	24	19	8
LANGUEDOC-ROUSSILLON	27	3	12	10	2
LIMOUSIN	5	1	1	0	3
LORRAINE	10	0	7	1	2
MIDI-PYRENEES	24	2	15	5	2
NORD-PAS-DE-CALAIS	21	1	9	10	1
PAYS DE LA LOIRE	19	0	10	7	2
PICARDIE	13	1	10	2	0
POITOU-CHARENTES	11	3	4	3	1
PROVENCE-ALPES-COTE D'AZUR	31	4	20	6	1
RHONE-ALPES	40	1	23	10	6
Total	402	34	216	108	45

Formes non materno-néonatales

En 2015, 368 formes non materno-néonatales ont été enregistrées, soit 92 % du total des cas sporadiques (Tableau 4).

Entre 2006 et 2015, le nombre d'infections non materno-neonatales a augmenté de plus de 100 cas par an, et une progression totale d'environ 82% a été observée depuis 1999.

Le nombre d'infections du système nerveux central a augmenté en valeur absolue à partir de 2012 (107 cas en 2015) mais sans augmentation en proportion, ce qui est liée à l'augmentation globale de toutes les formes cliniques (Tableau 4).

Le nombre de formes septicémiques a également augmenté en valeur absolue à partir de 2013 sans augmentation en proportion par rapport aux autres formes.

Ainsi, ces résultats montrent que l'augmentation du nombre global de cas de listériose en France est attribuable à une augmentation homogène du nombre des cas d'infections non-materno-neonatales.

Les autres formes cliniques représentent 12 % des cas non materno-néonatales en 2015. Le Tableau 6 décrit la répartition de ces infections de 2006 à 2015.

Tableau 6. Répartition des autres formes cliniques de 2006 à 2015

Autres formes	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Vasculaire	1	4	0	1	0	2	1	1	1	2	13
Adénopathie	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	5
Endocardite	2	0	0	1	0	0	0	1	2	2	8
Os/articulaire	4	3	8	7	4	2	5	6	8	18	65
Digestive	0	1	0	0	1	1	3	1	1	3	11
Foie	1	0	2	2	1	0	0	0	0	2	8
Œdème	1	1	2	2	6	0	0	0	0	0	12
Erysipèle	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Infection d'ascite	5	3	6	3	10	3	12	7	4	9	62
Infection urinaire	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	4
Pneumopathie	0	0	1	1	2	1	3	1	3	3	15
Prostatite	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Oculaire	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
Cutanée	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
Total	16	12	19	19	26	9	27	18	20	45	211

Les infections ostéoarticulaires, biliaires et urinaires ont fait l'objet d'analyses spécifiques dont les résultats ont été publiés ou présentés sous forme de posters. D'autres travaux sont en cours de finalisation sur les infections endovasculaires et les infections de liquide d'ascite.

Une revue sur les formes oculaires coordonnée par l'ECDC et intégrant les cas survenus en France depuis 1987 a été soumise pour publication.

Terrain

Des renseignements cliniques accompagnent chaque souche à leur réception au CNRL. Il s'agit d'informations transmises par le biologiste. Des données étaient renseignées dans 92 % des cas en 2015, contre 89% pour la période de 2011 à 2014. Dans 49% des cas renseignés en 2015 une ou plusieurs pathologies sous-jacentes ont été rapportées (cancer, cirrhose, éthylisme, diabète, dialyse, infection par le VIH, transplantation d'organe ou traitement immunosuppresseur [32]), contre 54% de 2011 à 2014.

Age et sexe des patients atteints de listériose

L'âge moyen des patients atteints de formes non MN était de 70 ans en 2015, avec une médiane de 71 ans (0 à 107 ans) de 2011 à 2014 (Tableau 7). Cet âge est stable entre 68 et 71 ans depuis 2006, alors qu'il n'était que de 62 ans en 1999, et reflète l'accroissement de la population âgée en France. La classe d'âge 1-44 ans présente un risque faible d'infection à *Lm* et la classe d'âge 15-44 ans est essentiellement associée aux formes NM.

Tableau 7. Age des patients (médiane) de 1999 à 2015 (Modifié de M. Tourdjman, SPF)

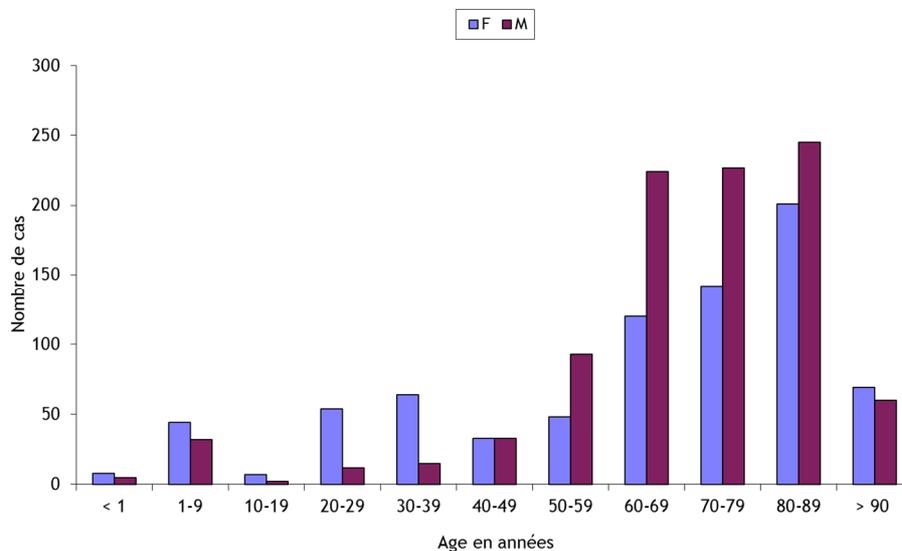
Année	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Age (médiane)	62	62	65	59	64	65	66	68	68	70	67	68	72	71	70	71	70

La répartition par tranche d'âge des formes non MN survenues entre 2011 et 2015 est présentée dans le Tableau 8 et la Figure 17. Pendant cette période, 83% des formes non MN sont survenues après 60 ans et 37 % après 80 ans. On note une prédominance masculine des cas survenant à partir de 50 ans (Figure 17). 59% des formes non MN de 2011 à 2015 concernaient des hommes.

Tableau 8. Distribution par classe d'âge, sexe et forme clinique des formes non materno-néonatales sporadiques de listériose survenues en France métropolitaine de 2011 à 2015

Sexe	Classe d'âge	Total	Infections du système nerveux central		
			Septicémies	Autres formes	
F	> 28 jours-20 ans	13	8	4	1
	21-60 ans	88	34	51	3
	60-80 ans	262	76	172	14
	> 80 ans	270	64	187	19
M	> 28 jours-20 ans	10	6	3	1
	21-60 ans	152	59	77	16
	60-80 ans	451	145	263	43
	> 80 ans	305	60	223	22
Total (sex ratio M/F)	> 28 jours-20 ans	23 (0,8)	14 (0,8)	7 (0,8)	2 (1)
	21-60 ans	240 (1,7)	93 (1,7)	128 (1,5)	19 (5,3)
	60-80 ans	713 (1,7)	221 (1,9)	435 (1,5)	57 (3,1)
	> 80 ans	575 (1,1)	124 (0,9)	410 (1,2)	41 (1,1)

Figure 17. Distribution par classe d'âge et par sexe des formes sporadiques de listériose survenues en France métropolitaine de 2011 à 2015



Cette prédominance masculine marquée de la listériose septicémique et neurologique constatée dans d'autres pays occidentaux [33, 34] est à ce jour inexplicable : exposition éthylotabagique plus importante chez les hommes ? Différences d'exposition à des aliments à risque ? Prédispositions génétiques liées au sexe ?

3.3.1.3.4. Distribution des souches selon le groupe PCR

Analyse générale

Les distributions par groupe PCR et par année des souches d'origine humaine isolées de 2006 à 2015 en France métropolitaine sont présentées dans le Tableau 9.

De 2011 à 2015, 4 cas humains ont été causés par des souches appartenant au variant V1 du Groupe PCR IVb, précédemment décrit par le CNRL. Ce variant a déjà été à l'origine de cas groupés en dehors de la France [17].

Le groupe PCR majoritaire des souches humaines isolées en 2015 était le sérotype IVb. Il représentait plus de 49% des souches, suivi du sérotype IIa (32%), IIb (16%), puis IIc (3%). Le groupe IIb a augmenté en 2015 par rapport aux années 2008 à 2014, mais il est rarement relié à des épidémies. Le groupe PCR IIc reste stable depuis 2010 et représente seulement 2 à 3% des souches. Depuis 2006, cette distribution est stable, et diffère de celle observée pour les souches alimentaires, pour lesquelles le groupe PCR IIa est majoritaire (51%).

Tableau 9. Répartition des groupes PCR par année depuis 2006

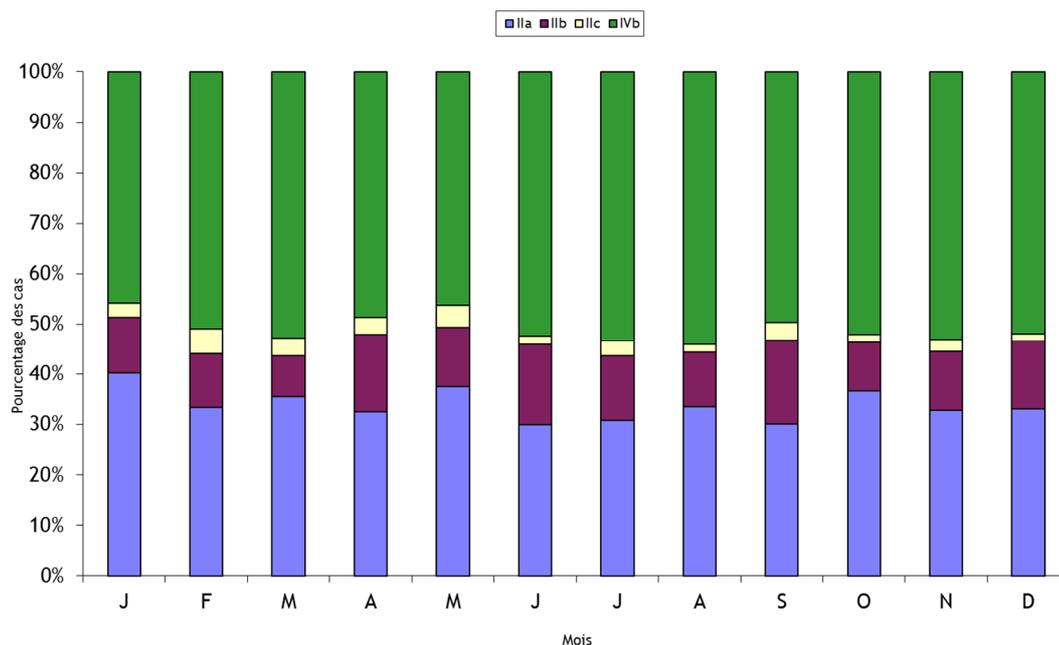
Groupe PCR	Souches du sérovar	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
IIa	1/2a ou 3a	79 (29%)	90 (30%)	89 (33%)	88 (28%)	100 (34%)	85 (31%)	98 (29%)	135 (37%)	137 (38%)	129 (32%)
IIb	1/2b, 3b ou 7	47 (17%)	45 (15%)	27 (10%)	47 (14%)	40 (13%)	40 (14%)	43 (13%)	32 (9%)	39 (11%)	65 (16%)
IIc	1/2c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

* variant du Groupe PCR IVb

Distribution temporelle des groupes PCR

La distribution mensuelle des 5 principaux groupes PCR ne semble pas mettre en évidence de saisonnalité pour les groupes PCR considérés (Figure 18).

Figure 18. Distribution mensuelle des souches de *Lm* des 4 principaux groupes PCR responsables de cas sporadiques de listériose en France métropolitaine de 2011 à 2015



Distribution régionale des groupes PCR

La distribution régionale des souches par groupe PCR ne met pas en évidence de prédominance géographique d'un groupe PCR particulier (Tableau 10).

Tableau 10. Distribution régionale des cas sporadiques de listériose survenus en France métropolitaine en 2015 selon les groupes PCR

Région	Total	IIa	IIb	IIc	IVb
ALSACE	10	2	1	0	7
AQUITAINE	15	3	4	0	8
AUVERGNE	15	6	2	0	7
BASSE-NORMANDIE	16	6	2	0	8
BOURGOGNE	7	3	2	0	2
BRETAGNE	29	8	6	1	14
CENTRE	17	8	3	0	6
CHAMPAGNE-ARDENNE	7	3	2	0	2
CORSE	4	1	0	0	3
FRANCHE-COMTE	9	4	1	0	4
HAUTE-NORMANDIE	10	5	0	1	4
ILE-DE-FRANCE	62	18	9	3	32
LANGUEDOC-ROUSSILLON	27	13	6	0	8
LIMOUSIN	5	0	1	0	4
LORRAINE	10	4	1	0	5
MIDI-PYRENEES	24	6	1	0	17
NORD-PAS-DE-CALAIS	21	7	2	0	12
PAYS DE LA LOIRE	19	3	7	1	8
PICARDIE	13	3	2	1	7
POITOU-CHARENTES	11	3	3	1	4
PROVENCE-ALPES-COTE D'AZUR	31	8	6	0	17
RHONE-ALPES	40	15	4	2	19
Total	402	129	65	10	198

Distribution des groupes PCR selon la forme clinique

Depuis 2006, les souches des groupes PCR IVb et IIa sont les plus fréquemment impliquées dans chaque type d'infection (Tableau 11 et Figures 19 et 20).

Le sérotype IVb est impliqué généralement dans plus de 50% des cas pour les infections MN et N, qui sont les infections les plus invasives (Tableau 11).

Le groupe PCR IIc est rarement responsable de cas de listériose, et est très rarement à l'origine de formes materno-néonatales ou neurologiques. En 2015, ce groupe PCR n'a d'ailleurs été à l'origine d'aucune de ces deux formes d'infection. Il est plus volontiers impliqué dans des infections septicémiques, comme le montre la figure 19.

Les infections liées à ce sérotype restent associées à une mortalité élevée, comme le suggèrent les données européennes de 2010-2012 (Communication ECDC), reflétant probablement la fragilité du terrain sous-jacent des patients infectés.

Figure 19. Distribution par année des groupes PCR IIa, IIb, IIc et IVb de *Lm* en fonction des formes de cas cliniques survenus en France métropolitaine de 2006 à 2015

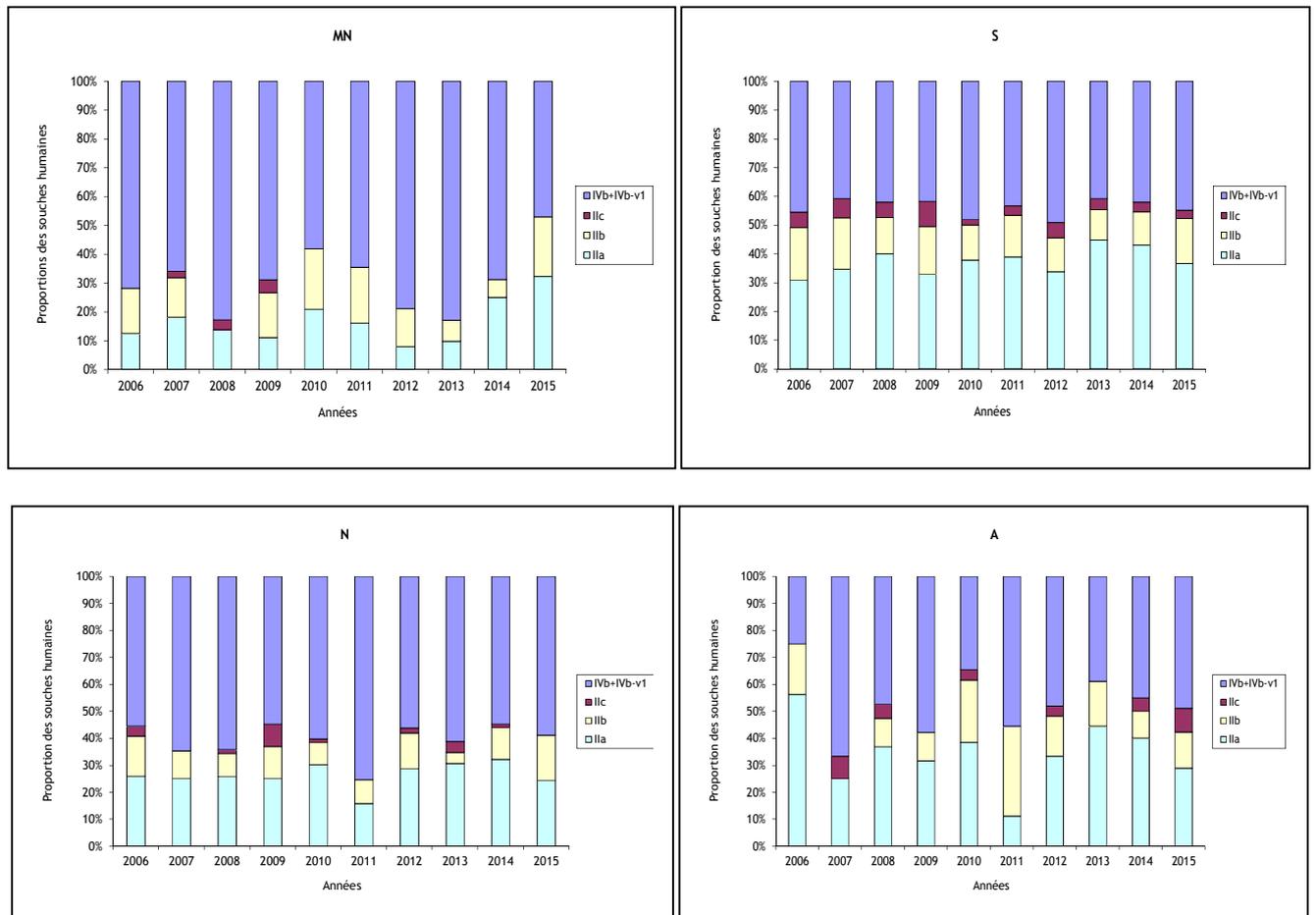
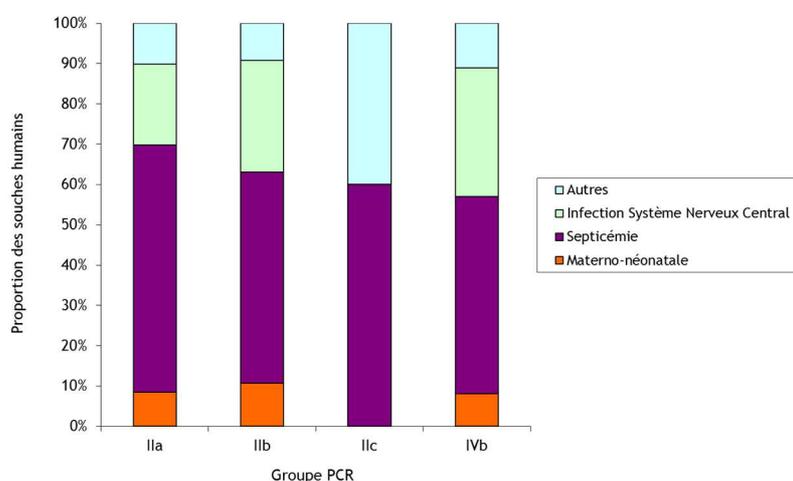


Tableau 11. Répartition des groupes PCR des souches selon les formes cliniques en 2015

	Materno-néonatale	Septicémie	Infections du système nerveux central	Autres formes	Total
IIa	11	79	26	13	129
IIb	7	34	18	6	65
IIc	0	6	0	4	10
IVb + IVb-v1*	16+0	97+0	63+0	22+0	198+0
L	0	0	0	0	0
Total	34	216	107	45	402

* variant Groupe PCR IVb

Figure 20. Distribution par groupes PCR des formes cliniques majoritaires de listériose survenues en France métropolitaine en 2015



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

3.3.1.4. Cas de listériose dans les DROM-TOM-COM

De 2011 à 2015, 28 cas sporadiques de listériose ont été rapportés dans les DROM-TOM-COM :

- 18 cas à la Réunion (10 formes septicémiques, 1 forme neuroméningée et 7 formes materno-neonatales) ;
- 4 cas en Guadeloupe (2 formes septicémiques, 1 forme neuroméningée et 1 forme materno-neonatale) ;
- 2 cas en Guyane (2 formes materno-néonatales) ;
- 2 cas à Mayotte (1 forme neuroméningée et 1 forme materno-neonatale) ;
- 2 cas en Polynésie Française (1 forme neuroméningée et 1 forme materno-neonatale).

Comme en France métropolitaine, le groupe PCR IVb était prédominant pour chaque type d'infection.

En 2015, 3 cas sporadiques de listériose (dont 1 forme neuroméningée et 1 forme materno-néonatale) ont été notifiés pour des patients résidant en Guadeloupe et 1 cas de listériose materno-néonatale à la Réunion.

L'île de la Réunion concentre le plus grand nombre de cas des DROM-TOM-COM étant donné qu'il s'agit du DROM-TOM-COM avec la plus grande population. Plusieurs enquêtes demandées par la CIRE et l'ARS de la Réunion ont été réalisées par le CNRL (dont une en 2014), mais aucune souche d'alertes-produits n'a été communiquée par ce DROM.

3.3.1.5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

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

Depuis 2001, toutes les souches étaient sensibles à la pénicilline, l'ampicilline, l'amoxicilline, l'imipénème, la gentamicine, l'acide fucidique et au chloramphénicol (Figure 21) [19].

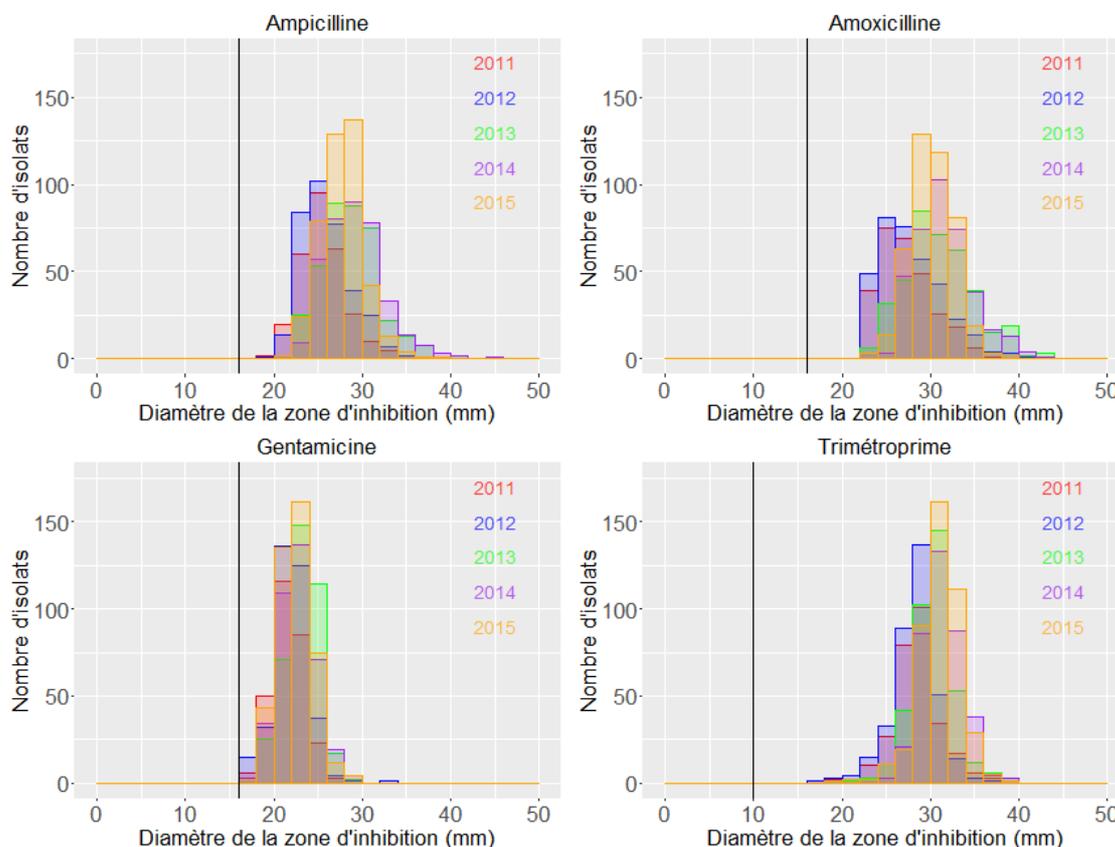
Les souches étaient très majoritairement sensibles à l'érythromycine, la ciprofloxacine, la tétracycline, la moxifloxacine, la levofloxacine, la vancomycine, la kanamycine et la streptomycine. Cependant, 1 souche résistante à l'érythromycine, 5 souches résistantes à la ciprofloxacine, 12 souches résistantes à la kanamycine, 5 souches résistantes à la streptomycine et 14 souches résistantes à la tétracycline ont été identifiées entre 2011 à 2015 (pas de résistances contacts).

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

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 [35] aucune observation similaire n'a été faite en France pour des souches cliniques. 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 [36, 37].

Les résistances à la rifampicine et au triméthoprimé mises en évidence de 1989 à 2011 chez deux souches différentes par le CNRL n'ont été observées chez aucune des souches humaines isolées par le CNRL entre 2011 et 2015 [18].

Figure 21. Distribution des diamètres des zones d'inhibition pour l'ampicilline, l'amoxicilline, la gentamicine et le triméthoprimé de 2011 à 2015 (Légende : le trait noir indique la valeur de référence EUCAST définissant la résistance).



3.3.1.6. Typage moléculaire des souches par macrorestriction d'ADN

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

Trente-huit pulsotypes combinés *Ascl/Apal* ont chacun occasionné au moins 10 cas humains en France de 2006 à 2011 (Tableau 12), dont 20 faisaient partie des 30 pulsotypes ayant occasionné des dépassements de seuil depuis 2006 (année de changement de la définition du dépassement de seuil).

Depuis 2006, les profils majoritaires des infections humaines étaient reliés au groupe PCR IVb, alors que depuis 2013, ils sont reliés en proportion égale aux groupes PCR IIa et IVb (Tableau 12).

Tableau 12. Classement par ordre de fréquence des pulsotypes des souches humaines de 2006 à 2015 (fréquence \geq 10 souches humaines). Les lignes correspondant aux profils endémiques sont grisées.

Profils de macrorestriction (Espèce- Groupe PCR- Pulsovar <i>Ascl-Apal</i>)	Complexes clonaux (CC ou ST)	Total souches humaines	Total souches par formes cliniques*				Présence dans un dépassement de seuil
			S	N	A	MN	
M-IVb-210792-210792	CC4	286	128	88	16	54	L06/02, L07/07, L08/03, L08/07, L09/06, L10/04, L10/09, L10/11, L11/05, L11/08, L12/02, L12/13, L13/03, L13/08, L14/16, L15/02, L15/09
M-IVb-200792-200792	CC1	219	102	66	11	40	L06/07, L07/01, L07/03, L07/05, L07/10, L07/14, L08/01, L08/05, L08/09, L09/01, L10/07, L10/08, L11/03, L12/05, L15/12
M-IVb-151005-151005	CC6	202	103	64	17	18	L06/04, L07/04, L08/06, L09/09, L10/05, L10/12, L11/07, L11/09, L12/07, L15/08
M-IVb-270801-050506	CC2	144	68	42	9	25	L06/05, L06/09, L07/02, L07/11, L07/16, L10/06, L11/04, L12/04, L12/10, L14/04, L15/13
M-IVb-011001-160602	CC1	143	75	43	4	21	L06/11, L07/13, L08/02, L09/02, L09/05, L09/10, L11/06, L12/08, L13/02, L13/06, L14/02, L14/09, L14/13, L14/17, L15/05, L15/11
M-IIa-010901-020701	CC8+16	142	92	26	5	11	L06/03, L06/10, L07/08, L07/12, L09/11, L13/01, L13/05, L13/10, L14/01, L14/15, L15/04, L15/16
M-IVb-151005-111206	CC6	93	43	25	8	17	L14/14
M-IIc-301006-301006		77	54	14	7	2	L09/08, L10/02
M-IIb-310801-310801	CC77	53	32	8	4	9	L11/01, L12/09, L14/12
M-IIb-010107-010107	CC224	52	32	10	6	4	L14/11, L15/07
M-IIa-050207-050207	CC37	50	35	9	3	3	L12/11, L13/11, L14/08
M-IIb-231006-310801	CC5	44	18	15	1	10	L14/07, L15/14
M-IIa-241006-241006	CC121	42	30	10	2	0	L09/03, L12/12, L13/04
M-IIa-080507-020507	CC7	38	21	13	3	1	L15/15
M-IVb-220803-200792	CC1	38	13	17	0	8	
M-IIa-271106-271106	CC1+155	36	24	6	1	5	L06/08
M-IIb-310801-061006	CC77	36	19	11	4	2	L15/10
M-IIa-260606-260606	CC18	30	20	5	3	2	L15/01, L15/06
M-IIa-130607-150408	CC475	29	18	5	5	1	
M-IVb-151005-220607	CC6	28	15	6	3	4	
M-IVb-071207-071207	CC4	27	10	8	2	7	L13/09
M-IVb-140907-070907	CC54	26	19	3	2	2	
M-IVb-141107-200792	CC1	24	8	11	1	4	
M-IIa-210408-150807bis	ST451	23	13	7	0	3	L14/05, L14/06
M-IIa-230905-230905	CC121	23	15	4	4	0	
M-IIb-090507-180407	CC3	18	13	2	2	1	
M-IIb-310801-121006	CC59	18	11	3	3	1	
M-IVb-180110-190110	CC1	16	4	6	0	6	
M-IIa-160907bis-031207	CC412	14	12	2	0	0	
M-IVb-200792-170407	CC1	14	4	7	1	2	
M-IIa-020707-151007	CC7	13	4	5	4	0	
M-IIa-290507-290507	CC14	13	11	2	0	0	
M-IVb-161007-210792	CC4	12	6	4	1	1	
M-IVb-170809-180809bis	CC220	12	5	3	0	4	
M-IIa-241006-090209bis	CC101+90	11	7	2	0	2	L14/03, L14/10
M-IIb-180906-180906	CC5	11	4	3	0	4	
M-IIa-201107-201107	CC415	10	7	3	0	0	
M-IIa-271006-050207	CC37	10	6	3	0	1	

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

Analyse des profils de macrorestriction d'ADN des souches humaines

Le Tableau 13 présente les fréquences des pulsotypes des souches humaines de 2006 à 2015.

Quelle que soit la forme, le profil M-IVb-210792-210792 du groupe IVb est majoritaire depuis 2006. Les principaux profils des infections humaines sont les profils endémiques retenus pour la surveillance microbiologique nationale. Une décroissance du nombre de nouveaux profils depuis 2008 est observable (Tableau 14), elle reflète la représentativité croissante de la base de données de pulsotypes du CNRL.

Tableau 13. Distribution par profils Ascl et Apal et groupe PCR des dépassements de seuil observés de 2006 à 2015

Profils Ascl/Apal	Complexes clonaux	Groupe PCR	Nombre de dépassements de seuil par année										Dépassements de seuil (N)
			2006**	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	
210792/210792	CC4	IVb	1	2	2	1	3	2	2	2	123	123	123
011001/160602	CC1	IVb	1	1	1	3	0	1	1	2	10	10	10
010901/020701	CC8+16	IIa	2	2	0	1	0	0	0	3	7	7	7
270801/050506	CC2	IVb	2	3	0	0	1	1	2	0	5	5	5
151005/151005	CC6	IVb	1	1	1	2	2	2	1	0	4	4	4
200792/200792*	CC1	IVb	1	4	3	1	2	1	1	0	3	3	3
050207/050207	CC37	IIa	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3	3
310801/310801	CC77	IIb	0	0	0	0	0	1	1	0	3	3	3
151005/111206	CC6	IVb	0	0	1	1	2	0	1	0	2	2	2
241006/241006	CC121	IIa	0	0	0	1	0	0	1	1	2	2	2
180110/190110	CC1	IVb	0	0	0	0	1	0	2	0	2	2	2
210408/150807bis**	ST451	IIa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
241006-090209bis	CC101+90	IIa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
010107/010107bis	CC224	IIb	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
231006-310801	CC5	IIb	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
260606-260606***	CC18	IIa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
020511/020511	CC1	IVb	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
071207/071207	CC4	IVb	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
141107/200792	CC1	IVb	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
020207bis-151007***	CC7	IIa	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
310801-160602***	CC77	IIb	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
080507-020507***	CC7	IIa	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
220803/200792	CC1	IVb	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
301006/301006	CC9	IIc	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
271106/271106	CC155	IIa	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
230908/180110bis	CC101	IIa	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
090507/180407	CC3	IIb	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
210792/201104	CC4	IVb	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160907/160907	ST36	IVb	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200792/170407	CC1	IVb	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total			11	16	9	11	13	9	13	11	17	16	66

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

Tableau 14. Fréquence et nombre de pulsotypes Ascl/Apal de 2008 à 2015 en France métropolitaine

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Pulsotype déjà connu identifié 1 fois	96	96	84	94	65	101	78	94
Pulsotype identifié 2 à 5 fois	26	24	33	31	22	39	28	40
Pulsotype identifié 6 à 12 fois	7	5	3	4	13	9	8	9
Pulsotype identifié > 12 fois	2	6	5	4	5	4	5	5
Nouveaux pulsotypes identifiés*	57	44	28	25	25	16	8	9
Total des pulsotypes Ascl/Apal	268	319	298	277	338	363	359	402

* nouveau pulsotype Ascl et/ou Apal

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

L'analyse des profils des souches humaines depuis 2006 maintient comme endémiques (n>12 cas/an) les profils M-IVb-210792-210792, M-IVb-200792-200792 et M-IVb-151005-151005. Les profils M-IVb-011001-160602 et M-IVb-270801-050506 pourraient être classés parmi les profils endémiques, bien que n'ayant pas encore atteint le seuil nécessaire des 12 cas pour certaines années (Tableau 15). La proposition de leur inclusion dans les profils endémiques sera faite lors de la prochaine réunion de cellule *Listeria*.

Tableau 15. Distribution par année des profils endémiques et profils candidats (*) pour les souches humaines de 2006 à 2015

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
M-IVb-270801-050506*	17	17	11	12	19	13	17	9	16	14
M-IVb-011001-160602*	9	16	12	18	10	15	11	18	20	24
M-IVb-151005-151005	20	18	10	16	22	20	21	18	24	33
M-IVb-200792-200792	25	20	18	24	14	18	22	24	28	32
M-IVb-210792-210792	19	23	25	22	26	23	29	47	32	34

3.3.1.7. Complexes clonaux et Sequence Type des souches

Grâce à l'utilisation du dictionnaire PFGE/MLST, le clone MLST de toutes les souches ayant été analysées par PFGE a pu être déterminé. Ainsi, une étude a pu être menée sur la prévalence et la distribution des clones MLST dans les échantillons cliniques et alimentaires, en collaboration avec le groupe de S. Brisse.

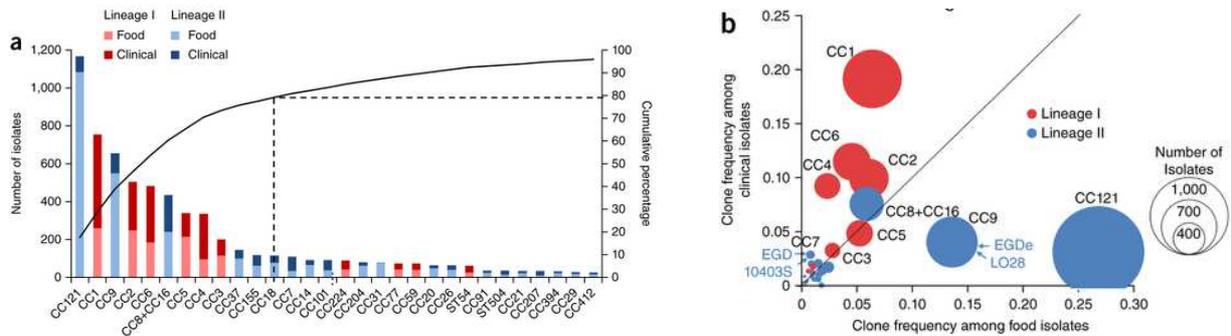
Aspect général

L'étude de la prévalence et de la distribution des clones MLST dans les échantillons cliniques et alimentaires a été menée sur 6633 isolats collectés de manière exhaustive par le CNRL entre 2005 et 2013 [13].

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 22). Les clones CC1, CC2, CC4 et CC6 sont significativement associés avec une origine clinique, alors que les clones CC9 et CC121 sont significativement associés à une origine alimentaire. Le complexe clonal CC1 est essentiellement associé aux formes neuroméningées, les clones CC1, CC2 et CC4 aux formes materno-néonatales et les clones CC8+CC16, CC9 ainsi que CC121 aux formes septicémiques. Cette étude, en utilisant certaines données de l'étude MONALISA, a également montré que les clones CC1, CC2, CC4 et CC6 infectent des individus faiblement ou non immunodéprimés plus facilement que les autres clones, alors que les clones CC9 et CC121 sont plus souvent isolés de patients très immunodéprimés. L'ensemble de ces résultats, combinés à des tests de virulence *in vivo*, a permis de montrer que les clones CC1, CC2, CC4 et CC6 sont hypervirulents, alors que les clones CC9 et CC121 sont hypovirulents.

Dans le but de permettre une identification rapide des clones MLST majeurs, le CNRL, en collaboration avec le groupe de S. Brisse, a mis au point en 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 [23]. **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.**

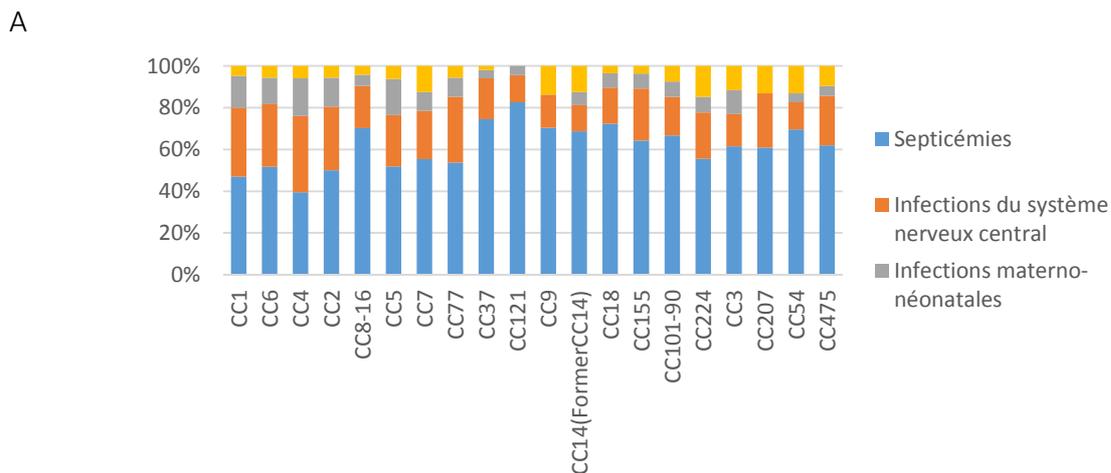
Figure 22. Prévalence et distribution des clones MLST de *Lm* dans les sources clinique et alimentaire d'isolement (Source : Maury, Tsai *et al.*, 2016). Seuls les clones avec plus de 10 isolats sont représentés. (a) Prévalence des clones MLST de *Lm*. La courbe représente le pourcentage cumulatif d'isolats 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 proportionnel au nombre d'isolats. Les positions des souches de référence sont indiquées.



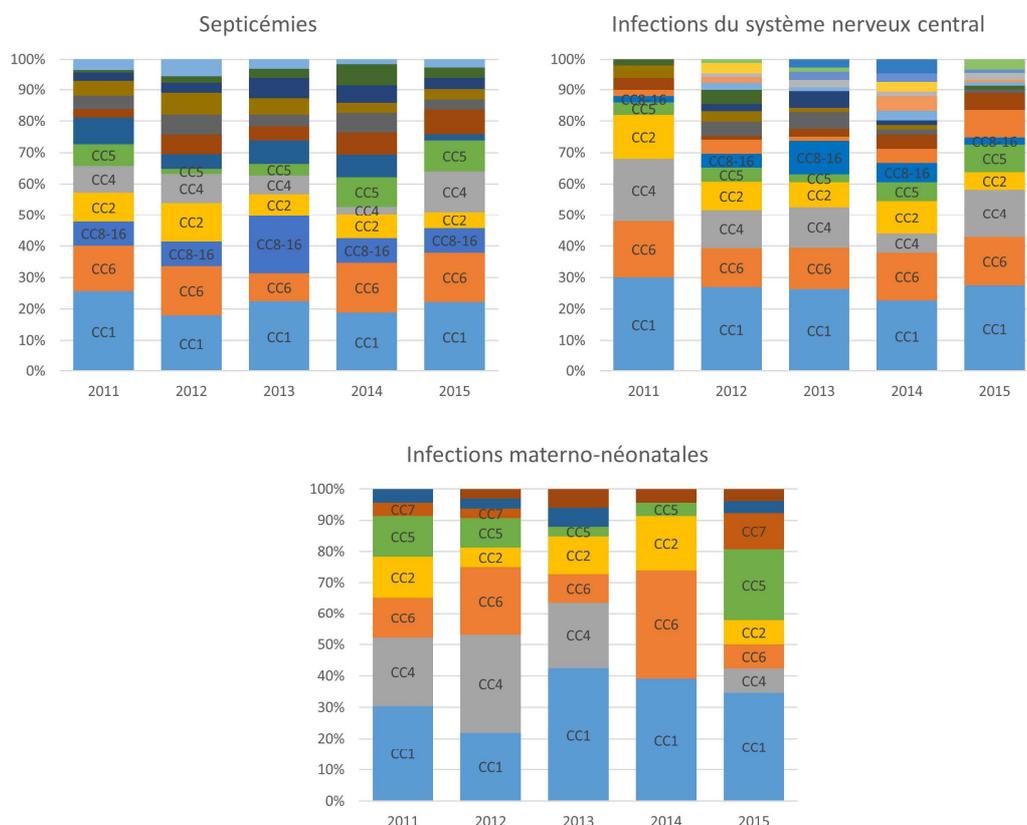
3.3.1.7.1. Etude 2011-2015

La Figure 23 montre la distribution, par formes cliniques, des différents clones des isolats cliniques isolés de 2011 à 2015. Elle montre une grande diversité des clones impliqués dans les infections cliniques, avec la prédominance des clones hypervirulents dans les infections neurologiques et materno-néonatales (CC1, 2, 4 et 6) [13].

Figure 23. Distribution par clones MLST et par formes cliniques des isolats cliniques collectés de 2011 à 2015. (A) Toutes années confondues. (B) Par année. Les clones les plus représentés sont indiqués.



B



3.3.2. Caractérisation des souches d'origine non humaine

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. En dehors de ce contexte, chaque professionnel de l'industrie agroalimentaire (laboratoires privés ou publics) peut, dans le cadre d'autocontrôles, envoyer ses souches pour caractérisation soit au CNRL, soit au Laboratoire National de Référence de *Lm* (LNRI) de l'ANSES à Maisons-Alfort. Le LNRI est également destinataire des souches des plans annuels de surveillance et de contrôle de *Lm* conduits par la DGAI, qui permettent d'estimer le niveau de contamination d'aliments de différentes filières. Le CNRL reçoit également des souches alimentaires dans le cadre de contre-expertises diligentées par les assureurs pour confirmation de résultats de caractérisation.

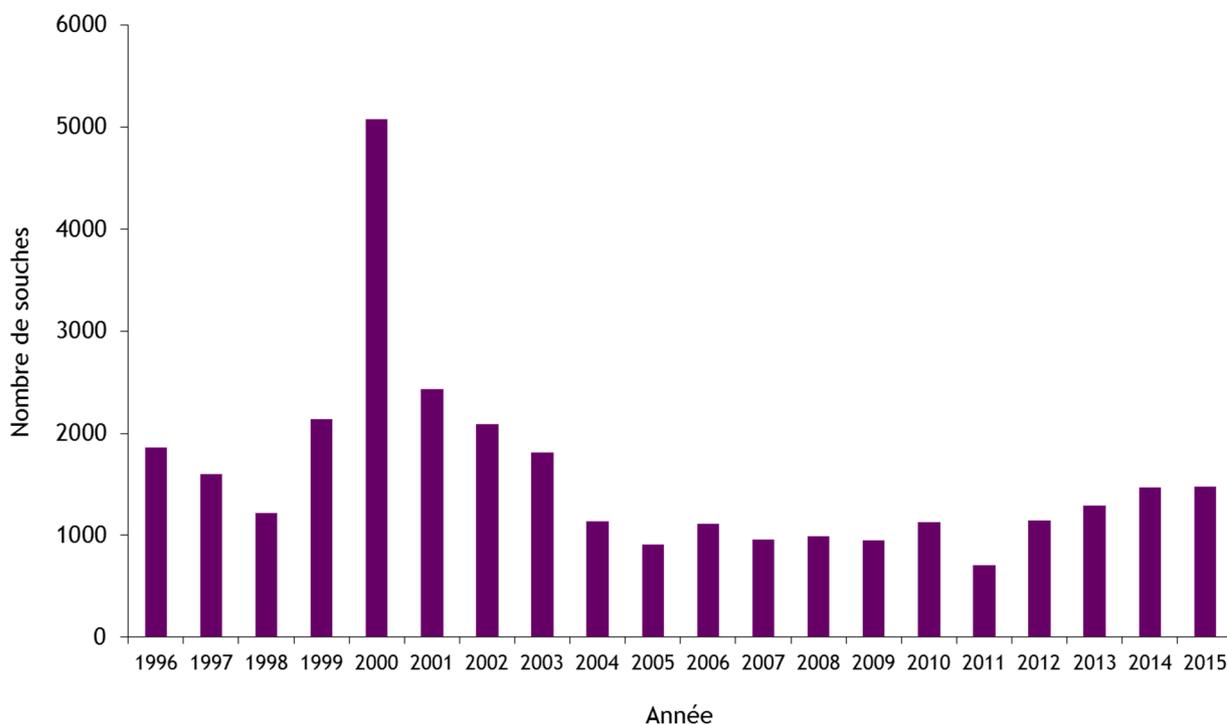
3.3.2.1. Analyse générale

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.

De 2011 à 2015, 6106 souches d'origine non humaine ont été adressées au CNRL par des laboratoires français. En 2015, 1488 souches de cette catégorie ont été reçues, ce qui représente une augmentation de 1% par rapport à 2014. Ce nombre est d'ailleurs en augmentation constante depuis 2011 (Figure 24).

Figure 24. Nombre annuel de souches d'origine non humaine adressées au CNRL par des laboratoires français depuis 1996



- Les laboratoires expéditeurs

La répartition des 6106 souches non humaines reçues au CNRL de 2011 à 2015 en fonction des catégories de laboratoires expéditeurs était la suivante :

- Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) : 1793 souches (29%) [2015 : 422]
- Laboratoires privés d'hygiène alimentaire : 4020 souches (66%) [2015 : 984]
- Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes : 114 souches (2%) [2015 : 9]
- Laboratoires ANSES – LNRI : 140 souches (2%) [2015 : 62]
- Laboratoires d'Hygiène de Centres Hospitaliers : 35 souches (<1%) [2015 : 11]
- Laboratoires de recherche : 4 souches (<1%) [2015 : 0]

De 2011 à 2015, 6036 des souches non humaines provenaient de France métropolitaine et 70 des DROM-TOM (Réunion et St Pierre-et-Miquelon).

La proportion de souches envoyées par les laboratoires vétérinaires départementaux (29% de 2011 à 2015, contre 38% de 2006 à 2011) est en diminution par rapport aux souches envoyées par les laboratoires d'hygiène alimentaire privés. Une information spécifique pourrait être proposée à ces laboratoires privés concernant les règles sur la gestion des alertes-produits.

- L'origine des souches

La répartition par origine des souches non humaines reçues entre 2011 et 2015 était la suivante :

- Souches isolées d'aliments : 5017 souches (82%) [2015 : 1177]
- Souches isolées de l'environnement : 980 souches (16%) [2015 : 274]
- Souches de recherche/sans information : 102 souches (2%) [2015 : 37]
- Souches isolées chez l'animal : 7 souches (<1%) [2015 : 0]

Les proportions respectives des origines des souches non humaines sont globalement stables d'année en année depuis 2006.

- Remarques globales de fonctionnement

Seules 88% des souches reçues entre 2011 à 2015 correspondaient à l'espèce *Lm* (95% en 2015) qui est la seule mentionnée comme critère microbiologique de sécurité dans les réglementations de sécurité sanitaire des aliments et de l'environnement. Cependant, certains laboratoires, à la demande de leurs clients, envoient des souches qu'ils identifient comme appartenant à d'autres espèces de *Listeria*, pour confirmation de l'espèce [38].

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.

3.3.2.2. Souches isolées d'aliments

3.3.2.2.1. Catégories de laboratoires ayant adressé les souches

La répartition des 5017 souches isolées d'aliments reçues au CNRL de 2011 à 2015 pour les différentes catégories de laboratoires expéditeurs était la suivante :

• Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD):	1427 (28%) [2015 : 361]
• Laboratoires privés d'hygiène alimentaire:	3350 (67%) [2015 : 766]
• Laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes:	114 (2%) [2015 : 9]
• Laboratoires ANSES-LNRI :	99 (2%) [2015 : 33]
• Laboratoires d'hygiène de Centres Hospitaliers :	27 (<1%) [2015 : 8]

En 2015, le nombre de souches isolées d'aliments reçues au CNRL a augmenté de 14% par rapport à 2014. De 2011 à 2015, 6 souches provenant d'échantillons prélevés dans le cadre de plans de surveillance ou de contrôle en cas de dépassement de seuils réglementaires ont été reçues par le LNRI. Elles ont donc été communiquées au CNRL.

3.3.2.2.2. Nombre de souches et distribution par espèce

Sur un total de 4560 souches d'origine alimentaire reçues au CNRL entre 2011 et 2015, 4401 (97%) ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Lm* (990 sur 1074 en 2015, 92%).

Durant cette période, 457 souches reçues par le CNRL n'ont pas été analysées (103 en 2015). Ces souches correspondaient en majorité à des souches isolées d'opérateurs agro-alimentaires que les autorités compétentes ont fait remonter au CNRL mais dont la caractérisation n'a pas été sollicitée par la suite dans les investigations (ex : 5 colonies par aliment et analyse d'une seule colonie).

De 2011 à 2015, 37 souches envoyées n'appartenaient pas au genre *Lm*; il s'agissait principalement des souches de *Bacillus circulans*, qui présentaient des colonies caractéristiques de *Listeria* spp. sur milieu Agar selon Ottaviani et Agosti [39]. Ces souches non *Listeria* sont dorénavant identifiées par Maldi-Tof (Bruker). 5 souches n'étaient pas viables à réception.

La répartition par espèce des 4560 souches de *Listeria* d'origine alimentaire reçues au CNRL entre 2011 et 2015 était la suivante :

• <i>L. monocytogenes</i>	:	4401 souches (97%) [2015 : 990]
• <i>L. innocua</i>	:	73 souches (2%) [2015 : 36]
• <i>L. welshimeri</i>	:	42 souches (<1%) ([2015 : 21]
• <i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	:	39 souches (<1%) [2015 : 26]
• <i>L. ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	:	2 souches (<1%) [2015 : 0]
• <i>L. seeligeri</i>	:	1 souche (<1%) [2015 : 0]
• <i>L. grayi</i>	:	1 souche (<1%) [2015 : 0]

- *L. thailandensis* (Nouvelle espèce) : 1 souche (<1%)

La caractérisation des isolats d'origine alimentaire reçus au CNR conduit à l'identification d'espèces rares voire à la description de nouvelles espèces qui sont dorénavant identifiées grâce au séquençage génomique.

↳ 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'identification de souches non *Lm*. 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 Etats-Unis et les industriels français de l'agro-alimentaire, principalement de l'industrie laitière.

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

La répartition par catégories d'aliments des 4401 souches de *Lm* d'origine alimentaire reçues au CNRL entre 2011 et 2015 était la suivante :

- Viande et produits carnés : 1747 souches (40%) [2015 : 443]
- Lait et produits laitiers : 1564 souches (35%) [2015 : 308]
- Produits de la pêche : 422 souches (10%) [2015 : 89]
- Végétaux : 44 souches (<1%) [2015 : 20]
- Autres aliments : 588 souches (13%) [2015 : 115]
- Sans information (confidentiel) : 36 souches (<1%) [2015 : 15]

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.

De 2011 à 2015, la distribution des souches dans les différentes catégories d'aliments est stable, malgré une diminution de la proportion des souches isolées de viandes et produits carnés ainsi que de la catégorie des autres aliments. A l'inverse, une augmentation des souches isolées de produits laitiers est observée.

En 2013, une résistance des souches alimentaires et environnementales aux ammoniums quaternaires, comme le chlorure de benzalkonium, 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 [40]. **En 2015, le CNRL a mis au point un outil de détection *in silico* des gènes de résistance aux antiseptiques.**

3.3.2.2.4. Distribution des souches alimentaires de *L. monocytogenes* par groupe PCR

La répartition des souches par groupes PCR et par catégories d'aliments est présentée dans le Tableau 16. Le groupe majoritaire est le groupe PCR IIa (sérovars 1/2a, 3a), quelle que soit la catégorie d'aliment, depuis 2006. Ce groupe PCR est cependant en diminution, puisqu'il représentait 70% des souches alimentaires isolées en 2013, contre 57% en 2014 (baisse de 24%). A l'inverse, le groupe PCR IVb était en nette augmentation de 2013 à 2014 (hausse de 32%). Les souches du groupe PCR L restent rares.

Comme l'illustrent la Figure 25 et le Tableau 16, le groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) ne représente que 18% des souches isolées d'aliments de 2011 à 2015, alors qu'il est le groupe le plus fréquemment impliqué en pathologie humaine. Ceci suggère une virulence accrue des souches du groupe PCR IVb par rapport aux autres [41-45], que nous avons démontrée expérimentalement [13]. Le groupe IIc n'est que rarement à l'origine de cas humains. Les souches du groupe PCR IVb expriment une InIA fonctionnelle (facteur de virulence permettant la traversée des barrières intestinale et placentaire de l'hôte) [42, 43, 45]. A l'inverse, les souches du groupe PCR IIc expriment en majorité une InIA tronquée et non fonctionnelle et sont hypovirulentes [13]. Ceci rend compte des fréquences respectives de ces groupes PCR dans les échantillons d'origine alimentaire et clinique [43].

Figure 25. Distribution par groupes PCR des souches de *Lm* cliniques et alimentaires en 2015 et entre 2006 et 2015

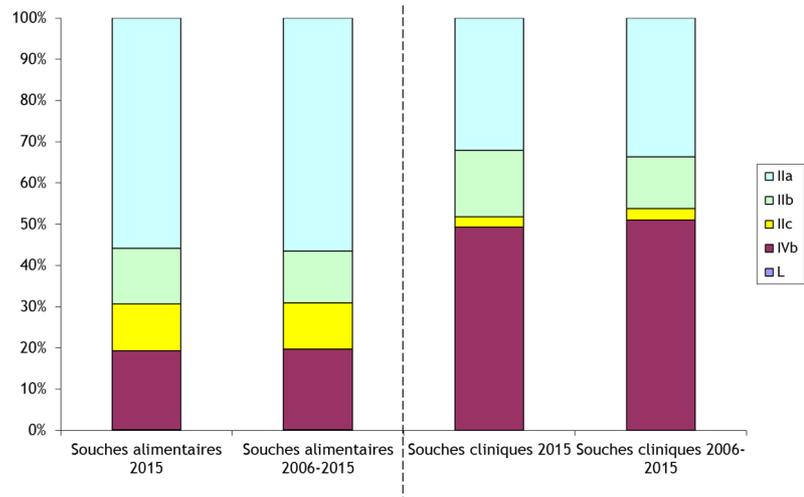


Tableau 16. Distribution par groupes PCR et par catégories d'aliments des souches alimentaires de *Lm* reçues au CNRL de 2011 à 2015, comparée à la distribution par groupe PCR des souches d'origine clinique. (A) De 2011 à 2015 et (B) en 2015.

(A)

Groupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total	Souches humaines
IIa	1030	872	350	31	362	17	2262 (51%)	585 (34%)
IIb	191	212	26	6	64	4	503 (11%)	219 (12%)
IIc	330	22	30	1	62	1	446 (10%)	49 (3%)
IVb	193	457	16	6	99	14	785 (18%)	883+4 (51%)
L	3	1	0	0	1	0	5 (<1%)	0 (0%)
Total	1747	1564	422	44	588	36	4401	1740

(B)

Groupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total	Souches humaines
IIa	247	138	63	17	77	11	553 (56%)	129 (32%)
IIb	67	46	4	2	14	1	134 (14%)	65 (16%)
IIc	81	3	17	0	11	0	112 (11%)	10 (2%)
IVb	48	121	5	1	12	3	190 (20%)	198 (49%)
L	0	0	0	0	1	0	1 (<1%)	0 (0%)
Total	443	308	89	20	115	15	990	402

3.3.2.2.5. Distribution des souches de *L. monocytogenes* par pulsotype

La comparaison entre les souches d'origines alimentaire et clinique illustre l'absence de corrélation systématique entre fréquence des profils des souches alimentaires et cliniques (Tableau 17).

- Ainsi, les profils M-IIa-241006-241006 et M-IIa-230905-230905 sont prédominants en alimentaire et dans les échantillons prélevés de l'environnement de production des aliments, alors qu'il n'y a eu que très peu de cas humains causés par le profil M-IIa-230905-230905 (<20) en 2011-2015.

- A l'inverse, l'un des profils PFGE les plus fréquents pour les souches cliniques (M-IVb-210792-210792) n'est pas un profil très fréquemment rencontré pour les souches alimentaires alors que ces souches cliniques et alimentaires appartiennent majoritairement aux clones hypervirulents CC4.

L'évaluation des fréquences relatives des profils des souches alimentaires et humaines lors de la surveillance microbiologique hebdomadaire de la listériose par le CNRL est importante. Un dépassement de seuil avec un profil rare permet de suspecter une souche présente, par exemple, dans une denrée importée, et peut simplifier l'investigation épidémiologique par rapport à des cas causés par un profil circulant largement en France. Dans le cadre d'investigations, des informations sur un profil particulier peuvent être demandées à d'autres pays européens (par le biais de la plateforme EPIS de l'ECDC).

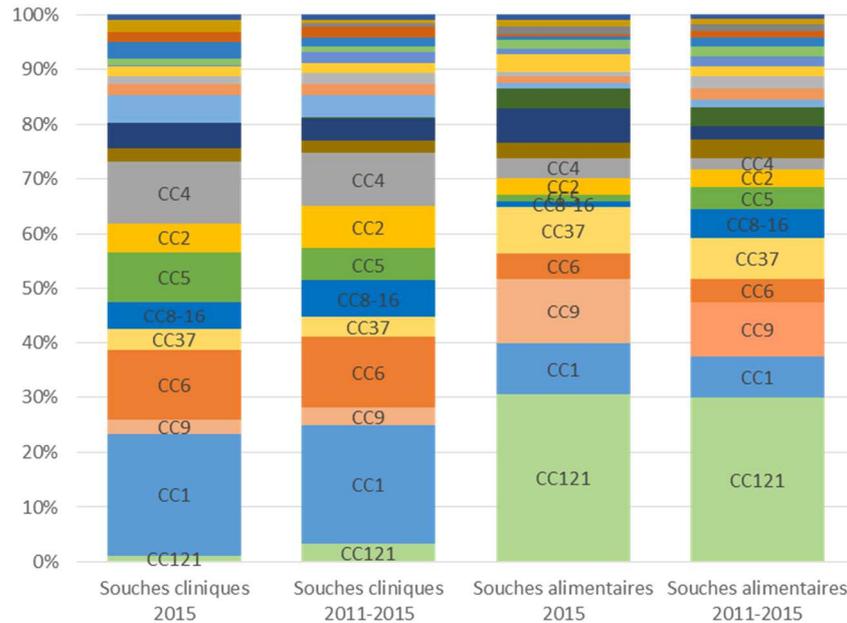
Tableau 17. Pulsotypes des souches alimentaires les plus fréquemment rencontrés (>20) en 2011-2015. Les profils endémiques des souches humaines sont grisés.

Profils de macrorestriction (Espèce-Groupe PCR-Pulsovar Ascl-Apal)	Nombre de souches alimentaires	Présence dans les profils des souches cliniques majoritaires (>10)	Nombre de dépassements de seuil 2011-2015 avec ce profil
M-IIa-241006-241006	446	X	X
M-IIc-301006-301006	307	X	X
M-IIa-230905-230905	230	X	
M-IIa-271006-050207	146		
M-IVb-200792-200792	136	X	X
M-IVb-151005-151005	98	X	X
M-IIa-010901-020701	87	X	X
M-IIa-270707-270707	87		
M-IIa-050207-050207bis	84	X	X
M-IIa-100608-230905	83		
M-IVb-210792-210792	78	X	X
M-IIb-310801-061006	70	X	
M-IVb-011001-160602	59	X	X
M-IIb-010107-010107	56	X	X
M-IIb-310801-310801	56	X	X
M-IIa-230905-230905bis	55	X	
M-IIa-241006-241006bis	49	X	
M-IIa-010901bis-020701bis	46	X	
M-IIa-020407-020407	41		
M-IIa-241006-230905bis	39		
M-IVb-140907-070907	38	X	
M-IIb-160807-150708	32		
M-IIa-260606bis-260606bis	32	X	X
M-IIa-080507-020507	29	X	X
M-IIa-271106-271106	29	X	X
M-IIa-070408-090408	27		
M-IIa-150708-160907bis	24		
M-IIa-160807-061007	24	X	X
M-IIa-260606-260606	23	X	X
M-IIb-231006-310801	23		
M-IIa-160907bis-230608bis	23	X	X
M-IIb-090507-180407	22	X	X
M-IVb-270801-050506	22		
M-IIa-111109-270707bis	22		

3.3.2.2.6. Distribution des souches alimentaires de *L. monocytogenes* par CC ou ST

Comme le montre la figure 26, l'analyse des souches sur la base des résultats de typage par MLST permet d'objectiver que certains complexes clonaux, comme CC121 et CC9, sont beaucoup plus souvent reliés aux souches alimentaires que cliniques ; ils ont été démontrés comme hypovirulents [13]. 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 [13].

Figure 26. Distribution des CCs et STs des souches de *Lm* isolées d'échantillons cliniques et alimentaires en 2015 et de 2006 à 2015.



3.3.2.3. Souches isolées de l'environnement

De 2011 à 2015, 980 souches (2015 : 274 souches, soit +64%) provenant de l'environnement ont été reçues au CNRL, adressées par des laboratoires vétérinaires départementaux (n=381, 2015 : 82), des laboratoires privés (n=598, 2015 : 192) et des services d'hygiène hospitalière.

Il s'agit d'échantillons prélevés sur des surfaces dans des industries agro-alimentaires ou isolées de réfrigérateurs dans le cadre d'enquêtes alimentaires.

Ces prélèvements ont été effectués en conformité avec l'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 *L. monocytogenes* (Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *L. monocytogenes* :

https://sites.anses.fr/en/system/files/LRUE%20Lm-Lignes%20directrices%20pr%C3%A9%20A9%3%A8vement_V3_20-08-2012.pdf).

Ces souches comprenaient des souches de *Lm* (n = 897), *L. innocua* (n = 32), *L. seeligeri* (n = 2), *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* (n = 1), *L. fleischmanii* (n = 1), *L. weihenstephanensis* (n = 2) et des souches n'appartenant pas au genre *Listeria* (n = 30). Quinze souches ont été réceptionnées au CNRL, mais n'ont pas été caractérisées, à la demande des autorités compétentes.

La répartition par groupe PCR des 897 souches de *Lm* environnementales isolées entre 2011 et 2015 est la suivante :

- groupe PCR IIa (sérovars 1/2a et 3a): 533 souches (59%) (2015 : 135)
- groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7): 134 souches (15%) (2015 : 60)
- groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c): 108 souches (12%) (2015 : 26)
- groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e): 121 souches (14%) (2015 : 31)
- groupe PCR L (autres sérovars): 1 souche sérotype 1/2a (<1%) (2015 : 0)

Comme pour les souches isolées d'aliments, les souches des groupes PCR IIa, IIb et IIc sont majoritaires et représentent 86 % des souches.

Les profils majeurs de macrorestriction d'ADN ($n > 10$) des souches de l'environnement sont différents de ceux identifiés en 2011-2015 et sont, par ordre d'importance décroissant : M-IIa-241006-241006, M-IIa-010901bis-020701bis, M-IIc-301006-301006, M-IIa-230905-230905, M-IIb-310801-310801, M-IIa-270707-270707, M-IVb-151005-151005, M-IVb-200792-200792, M-IVb-210792-210792, M-IIa-230705-190308, M-IIa-260606-260606, M-IIa-190410-010607bis, M-IIa-160907-031207 et M-IIb-310801bis-310801. Cette liste inclut les profils majoritaires des souches alimentaires et une partie des profils majoritaires des souches cliniques.

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 mieux comprendre les mécanismes d'échange de souches entre l'environnement naturel, les aliments et l'hôte humain.

3.4. Contribution à l'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 cet appel à candidature. Ces données ne peuvent pas être divulguées à des tiers sans autorisation. Elles sont à la disposition de SPF et de la cellule Listeria au CNRL.

3.4.1. Suspensions d'infections nosocomiales

À 97 reprises, de 2011 à 2015 (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. Depuis 2012, en parallèle des formes neuroméningées, une bactériémie contractée à l'hôpital de plus de 15 jours et sans apport de nourriture de l'extérieur doit entraîner une investigation de la cuisine hospitalière. Ainsi, 7 bactériémies survenues de 2012 à 2015 contractées chez des patients hospitalisés depuis plus de 15 jours ont été investiguées (3 en 2015).

Dix infections nosocomiales ont été identifiées. Pour un centre hospitalier, la persistance d'un clone de *Lm* pendant 3 ans (de 2011 à 2013) a pu être identifiée suite à une enquête DGAI, SPF et CNRL. Une publication et un poster ont été réalisés à ce sujet avec les membres du CLIN et de SPF [46, 47].

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

3.4.2. Demande des ARS et CIRE

De 2011 à 2015, le CNR a été sollicité par 3 ARS (Languedoc Roussillon, Réunion, Picardie) et 6 CIRE (Océan indien, Alsace, Bretagne, Guadeloupe, Rhône Alpes, Languedoc Roussillon) dans le cadre d'investigations autour de cas humains ou suite à un accroissement anormal du nombre de cas de listériose survenus sur une zone géographique donnée.

3.4.3. Dépassements de seuils

De 2011 à 2015, le CNRL a notifié 66 dépassements de seuils (16 en 2015) (défini en annexe B 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) (Tableaux 18 et 19). Cette valeur est stable depuis 2006, comprise entre 9 et 16 par an. Cependant, il faut noter que le système de surveillance a changé en 2012, avec la définition des profils endémiques. Ces mesures ont concerné 1326 souches de 2011 à 2015 (315 en 2015), incluant 488 souches humaines, 695 souches alimentaires, 142 souches d'environnements agro-alimentaires et 1 souche vétérinaire.

Parmi les souches alimentaires et environnementales, 636 (91%) ont été isolées dans le cadre d'alertes-produits DGAI, ce qui est stable depuis 2011 (entre 85 et 91%).

Les souches humaines liées à un dépassement de seuil de 2011 à 2015 représentaient 27 % du total des souches humaines reçues au CNRL.

- La répartition des formes cliniques reliées à ces souches est stable d'année en année (N = 30%, S = 49%, A = 7% et MN = 14%).

- Les souches impliquées dans ces dépassements de seuil appartenaient majoritairement au groupe PCR IVb (73%), puis au groupe PCR IIa (18%) (Tableau 19). Depuis 2014, le nombre de dépassements de seuil dus au groupe PCR IIa est en augmentation.

- Le profil PFGE majoritaire de 2011 à 2015 était le M-IVb-011001-160602 et non plus le profil endémique M-IVb-210792/210792 comme de 2006 à 2010. En effet, le profil M-IVb-011001-160602 est de plus en plus fréquent à l'origine de dépassements de seuil et est en passe de devenir un profil endémique en France. Chaque année depuis 2006, 1 à 2 dépassements de seuil ont été causés par des profils n'ayant jamais été impliqués dans des dépassements de seuil ; 4 depuis 2014.

- Les souches impliquées dans ces dépassements de seuil appartenaient majoritairement aux complexes clonaux CC1 (17 dépassements au total), CC4 (n = 10), CC8+CC16 (n = 7), CC6 (n = 6) et CC5 (n = 4).

De 2011 à 2015, 10 dépassements de seuil (5 en 2015), dont 6 épidémies, ont été reliés épidémiologiquement et avec confirmation microbiologique à des aliments.

Tableau 18. Nombre de dépassements de seuil de listériose, de cas associés à des dépassements de seuil et de cas sporadiques survenus en France entre 2000 et 2015 (adapté de Goulet et coll., 2008 [10, 48])

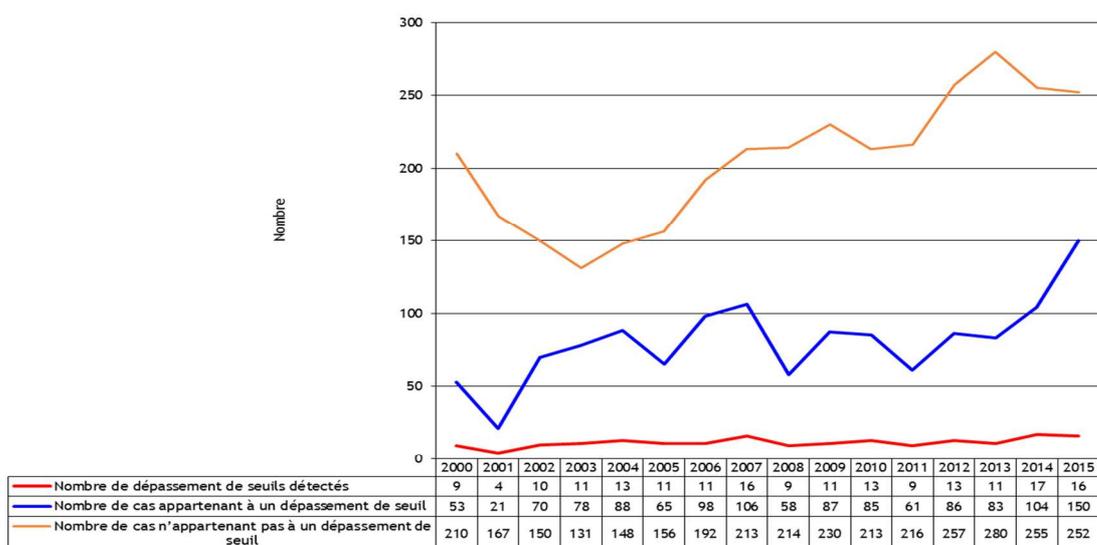


Tableau 19. Synthèse des dépassements de seuils identifiés par le CNRL de 2011 à 2015.

Numéro	Date d'ouverture	Durée (jours)	Caractéristiques des souches				Cas groupé	Epidémie
			Groupe PCR	Profils Ascl	Profil Apal	CC/ST		
L11/01*	31/01/2011	21	IIb	310801	310801	CC5		
L11/02*	23/05/2011	29	IVb	020511	020511	CC1		
L11/03	21/06/2011	97	IVb	200792	200792	CC1		
L11/04	21/06/2011	134	IVb	270801	050506	CC2		
L11/05	04/07/2011	28	IVb	210792	210792	CC4		
L11/06	25/07/2011	49	IVb	011001	160602	CC1		
L11/07	16/08/2011	83	IVb	151005	151005	CC6		
L11/08	05/09/2011	72	IVb	210792	210792	CC4		
L11/09	12/12/2011	70	IVb	151005	151005	CC6		
L12/01	23/01/2012	35	IVb	180110	190110	CC1		
L12/02	07/02/2012	48	IVb	210792	210792	CC4		
L12/03	02/04/2012	28	IVb	180110	190110	CC1		
L12/04	24/04/2012	69	IVb	270801	050506	CC2		
L12/05	30/04/2012	106	IVb	200792	200792	CC1		
L12/06	07/05/2012	8	IVb	151005	111206	CC6		
L12/07	12/06/2012	55	IVb	151005	151005	CC6		
L12/08	16/07/2012	29	IVb	011001	160602	CC1		
L12/09	16/07/2012	21	IIb	310801	310801	CC5		
L12/10	06/08/2012	77	IVb	270801	050506	CC2		
L12/11*	01/10/2012	50	IIa	050207	050207	CC37		
L12/12	01/10/2012	35	IIa	241006	241006	CC121		
L12/13	01/10/2012	133	IVb	210792	210792	CC4		X
L13/01	08/04/2013	28	IIa	010901	020701	CC8+CC16		
L13/02	08/04/2013	43	IVb	011001	160602	CC1		
L13/03	15/04/2013	36	IVb	210792	210792	CC4		
L13/04	01/07/2013	35	IIa	241006	241006	CC121		
L13/05	15/07/2013	63	IIa	010901	020701	CC8+CC16		
L13/06	26/08/2013	84	IVb	011001	160602	CC1		
L13/07*	26/08/2013	74	IVb	141107	200792	CC1		X
L13/08a	17/09/2013	349	IVb	210792	210792	CC4		X
L13/09*a	30/09/2013	336	IVb	071207	071207	CC4		X
L13/10	28/10/2013	35	IIa	010901	020701	CC8+CC16		
L13/11	16/12/2013	28	IIa	050207	050207bis	CC37		
L14/01	07/01/2014	20	IIa	010901	020701	CC8+CC16		
L14/02	27/01/2014	98	IVb	011001	160602	CC1		X
L14/03*	10/02/2014	28	IIa	241006	090209bis	CC101+CC90		
L14/04	10/03/2014	71	IVb	270801	050506	CC2		
L14/05*a	10/03/2014	43	IIa	210408	150807bis	ST451		X
L14/06a	16/06/2014	63	IIa	210408	150807bis	ST451		X
L14/07*	16/06/2014	42	IIb	231006	310801	CC5		
L14/08	20/06/2014	45	IIa	050207	050207	CC37		
L14/09	28/07/2014	21	IVb	011001	160602	CC1		
L14/10	12/08/2014	20	IIa	241006	090209bis	CC101+CC90		
L14/11	19/08/2014	13	IIb	010107	010107bis	CC224		
L14/12	25/08/2014	79	IIb	310801	310801bis	CC77		
L14/13	22/09/2014	51	IVb	011001	160602	CC1		
L14/14	22/09/2014	35	IVb	151005	111206	CC6		
L14/15	30/09/2014	34	IIa	010901	020701	CC8+CC16		
L14/16	15/12/2014	36	IVb	210792	210792	CC4 + ST217		
L14/17	22/12/2014	29	IVb	011001	160602	CC1		
L15/01*	02/02/2015	21	IIa	260606	260606	CC18		
L15/02	16/02/2015	70	IVb	210792	210792	CC4		X
L15/03*	23/02/2015	22	IIa	020707bis	151007	CC7		
L15/04	09/03/2015	22	IIa	010901	020701	CC8-CC16		
L15/05	20/03/2015	73	IVb	011001	160602	CC1		
L15/06	13/04/2015	21	IIa	260606	260606	CC18		X
L15/07	28/05/2015	28	IIb	010107	010107	CC224		X
L15/08	08/06/2015	176	IVb	151005	151005	CC6		
L15/09*	15/07/2015	70	IVb	210792	210792	CC4		X
L15/10	03/08/2015	84	IIb	310801	061006	CC77		X
L15/11	04/08/2015	146	IVb	011001	160602	CC1	X	
L15/12	07/10/2015	138	IVb	200792	200792	CC1		
L15/13	12/10/2015	35	IVb	270801	050506bis	CC2		
L15/14	19/10/2015	84	IIb	231006	310801bis	CC5		
L15/15*	09/11/2015	49	IIa	080507	020507	CC7		X
L15/16	07/12/2015	70	IIa	010901	020701	CC8+CC16		

* Nouveaux Profils par rapport aux années antérieures ; a, Dépassements de seuil fusionnés

3.4.4. Toxi-infections Alimentaires Collectives et Epidémies

- Toxi-infections alimentaires collectives

En 2011, dans une famille dont tous les membres ont consommé du pâté contaminé par *Lm*, un enfant a été atteint d'une infection du système nerveux central. Les selles du frère et de la sœur de cet enfant, qui présentaient une diarrhée, ont été analysées. Une souche de *Lm*, isolée des selles du frère de cet enfant, était de caractéristiques microbiologiques similaires à celles de la souche responsable de l'infection de cet enfant (Figure 27, confidentielle).

Il s'agit d'un exemple rare dans lequel une TIAC à *Lm* a pu être mise en évidence, ce pathogène n'étant à ce jour pas considéré classiquement comme responsable de TIAC. Un épisode similaire vient de se produire en 2016. Ceci justifierait à notre sens d'ajouter *Lm* à la liste des agents responsables de TIAC à rechercher systématiquement dans ce contexte, y compris en l'absence de listeriose invasive avérée.

- Epidémies

En accord avec SPF et pour permettre une harmonisation avec le terme anglosaxon « Outbreak », les cas groupés (dus à des souches présentant les mêmes caractéristiques microbiologiques) constituent une épidémie lorsqu'est identifiée la source de contamination alimentaire. Les aliments les plus souvent en cause sont les fromages au lait cru et les aliments industriels prêts à être consommés (Tableau 1 et Figure 28 confidentielle).

Le CNRL participe à des investigations dans le cadre d'épidémies étrangères au moyen de la plateforme EPIS de l'ECDC. Ce système a été utilisé en 2014, lors d'une épidémie danoise liée à un produit de charcuterie, ou encore en 2015 lors d'une épidémie italienne due à des produits de charcuterie contaminés.

3.4.5. Alertes-produits DGAI et investigations alimentaires

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 DGAI 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.

De 2011 à 2015, 4004 souches ont été adressées au CNRL dans le cadre des 1482 alertes-produits DGAI et DDPP de 2011 à 2015. Ces souches incluaient 3526 souches alimentaires et 478 souches d'environnements agro-alimentaires. Le nombre de souches par alerte-produit variait de 1 à 69. 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).**

De 2011 à 2015, le taux moyen d'exhaustivité de récupération des souches d'alertes-produits est resté stable, estimé à 73% en moyenne.

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

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

De 2011 à 2015, 97% 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 4004 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) : 2485 souches (62% ; 523 en 2015),
- Groupe PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b et 7) : 469 souches (12% ; 121 en 2015),
- Groupe PCR IIc (sérovars 1/2c et 3c) : 371 souches (9% ; 136 en 2015),
- Groupe PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) : 675 souches (17% ; 165 en 2015),
- Groupe PCR L (sérovars 4a, 4ab, 4c) : 4 souches (<1% ; 0 en 2015)

De 2011 à 2015, les profils *Ascl*/*Apal* de *Lm* les plus fréquents à l'origine d'alertes-produits sont, par ordre décroissant, M-IIa-241006-241006, M-IIc-301006-301006, M-IIa-230905-230905, M-IIa-271006-050207, M-IVb-200792-200792, M-IVb-151005-151005, M-IIa-100608-230905, M-IIa-010901-020701, M-IIa-050207-050207bis, M-IIb-310801-310801, M-IVb-210792-210792, M-IIa-270707-270707 et M-IIb-310801-061006. Les dénombrements de *Lm* dans les échantillons concernés par les alertes-produits variaient de < 10 à 1,1.10⁶ UFC/g. Comme depuis 2007, les produits de charcuterie sont parmi les aliments les plus contaminés et, selon les données de l'IFIP (Institut du Porc), la consommation des produits de charcuterie est en augmentation au France (+1,8% en 2015).

En 2013 et 2014, indépendamment de ces alertes-produits, le CNRL a réalisé 5 investigations autour de cas groupés, menant à l'identification des aliments à l'origine de ces cas (2 fromages de brebis, du Lonzu Corse, du jambon et du milkshake).

3.4.6. Alertes-produits DGCCRF

Les 63 alertes-produits provenant de la DGCCRF ou de ses laboratoires survenus de 2011 à 2015 ont donné lieu à la réception au CNRL de 81 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 transformés en alertes-produits DGAI.

3.4.7. Alerte européenne et internationale

De 2011 à 2015, 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 précédemment décrites), soit par l'OMS/FAO au moyen du réseau INFOSAN. À la demande de la DGAI, le CCOMS et le CNRL récupèrent, 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. De même, les homologues étrangers du CNRL peuvent 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.

Tableau 20. Liste des Urgent Inquiries auxquelles le CNRL a participé de 2011 à 2015 (Source : EPIS database, ECDC, Stockholm).

Référence	Titre	Ouverture	Pays
UI-105	<i>Listeria monocytogenes</i> , Finnish type <i>Ascl</i> 62	08/02/2011	Finland
UI-111	outbreak <i>Listeria</i> 1/2a in Belgium	05/04/2011	Belgium
UI-152	Emergence of a strain of <i>Listeria monocytogenes</i> with new PFGE profiles	30/01/2012	France
UI-167	Outbreak of listeriosis in the U.S. possibly associated with imported cheese	09/08/2012	United States
UI-173	Listeriosis outbreak in Finland	13/09/2012	Finland
UI-179	Outbreak of listeriosis in France, sept-oct 2012	26/10/2012	France
UI-200	<i>Listeria</i> cluster - 2013-05.LIST.01.APAI.0031.ASCI.0047	25/07/2013	ECDC
UI-206	Increase in listeriosis cases in Germany	19/08/2013	Germany
UI-229	Listeriosis in the United States with possible association to Caucasus/the Middle East	20/12/2013	United States
UI-232	Suspected outbreak of listeriosis in Sweden	31/01/2014	Sweden
UI-241	Increase in a rare type of <i>Listeria monocytogenes</i> in the United Kingdom	28/02/2014	United Kingdom
UI-262	Listeriosis in Denmark	13/08/2014	Denmark
UI-283	<i>Listeria monocytogenes</i> cluster in Canada associated with Mortadella consumption	10/03/2015	Canada

UI-286	<i>Listeria</i> Outbreak associated with certain Blue Bell brand ice cream	23/03/2015	United States
UI-298	<i>Listeria</i> PFGE cluster Germany 2012-2015	07/07/2015	Germany
UI-300	<i>Listeria monocytogenes</i> cluster	20/07/2015	Denmark
UI-330	Increased number of listeriosis reported cases in 2015, Greece	08/12/2015	Greece

Par exemple, de 2011 à 2015, SPF a sollicité le CNRL pour comparer les profils PFGE :

- de souches d'une alerte-produit RASFF liée à un fromage de brebis au lait cru,
- de souches humaines d'une épidémie suisse,
- d'une souche à l'origine d'une neurolistériose en France.

Par ces liens privilégiés et historiques avec le réseau européen de CNR, le CNRL français peut facilement échanger souches, données, profils PFGE et génomes, avec l'accord des autorités compétentes.

De 2011 à 2015, le CNRL a investigué 17 « urgent inquiries » (Tableau 20) de l'ECDC (communiquées sur la base EPIS) et a ouvert 2 « urgent inquiries ». A chaque Urgent inquiry, en lien avec SPF, le CNRL communique sur EPIS une synthèse des souches d'origines humaine et alimentaire ayant des profils PFGE similaires.

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

3.4.8. Enquête sur les formes neuroméningées

Cette enquête est menée par les différents partenaires de la Cellule *Listeria*, coordonnée par SPF et chargée de prendre des décisions sur les investigations et actions à mettre en œuvre.

Le protocole d'investigation spécifique des formes neuroméningées a commencé en août 2001.

On définit un cas d'infection neuroméningée comme tout cas de listériose avec présence de signes cliniques d'atteinte neuroméningée avec isolement d'une souche de *Lm* à partir du sang ou du LCR. 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). Les membres de la Cellule *Listeria* sont informés de chaque cas de forme neuroméningée par SPF. Le CNRL réalise un groupage PCR et un typage par macrorestriction d'ADN avec les enzymes *Ascl* et *Apal* (et *SmaI*, si nécessaire) sur les souches alimentaires prélevées et celle du patient. Il compare ensuite les pulsotypes des souches afin d'identifier rapidement l'aliment à l'origine du cas et transmettre les résultats à la Cellule *Listeria*.

En 2015, 89% (88/99) 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 DGAI, 31 investigations n'ont pas été suivies d'enquêtes locales donnant lieu à des prélèvements dans le réfrigérateur du patient (35% en 2015 ; 32% en 2014 ; 26% en 2013 ; 40% en 2012 ; 22% en 2011).

En 2015, parmi les 19 cas pour lesquels des souches ont pu être isolées du réfrigérateur du patient ; à 11 reprises les caractéristiques microbiologiques de la souche du patient et de la souche isolée de son frigo étaient similaires (Figure 32 confidentielle) [49].

Ainsi, les **prélèvements à domicile effectués pour les cas de listérioses neuroméningées sont un complément utile à la DO et permettent, dans plus de 50% des cas où *Lm* est isolé, d'identifier rapidement la source de contamination.**

3.4.9. Expertises judiciaires

Depuis 2013, il y a une demande accrue auprès de SPF de restitution de rapports individuels d'investigations autour de formes neuroméningées de listérioses. 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 DGAI pour les investigations menées concernant l'origine de la contamination alimentaire.

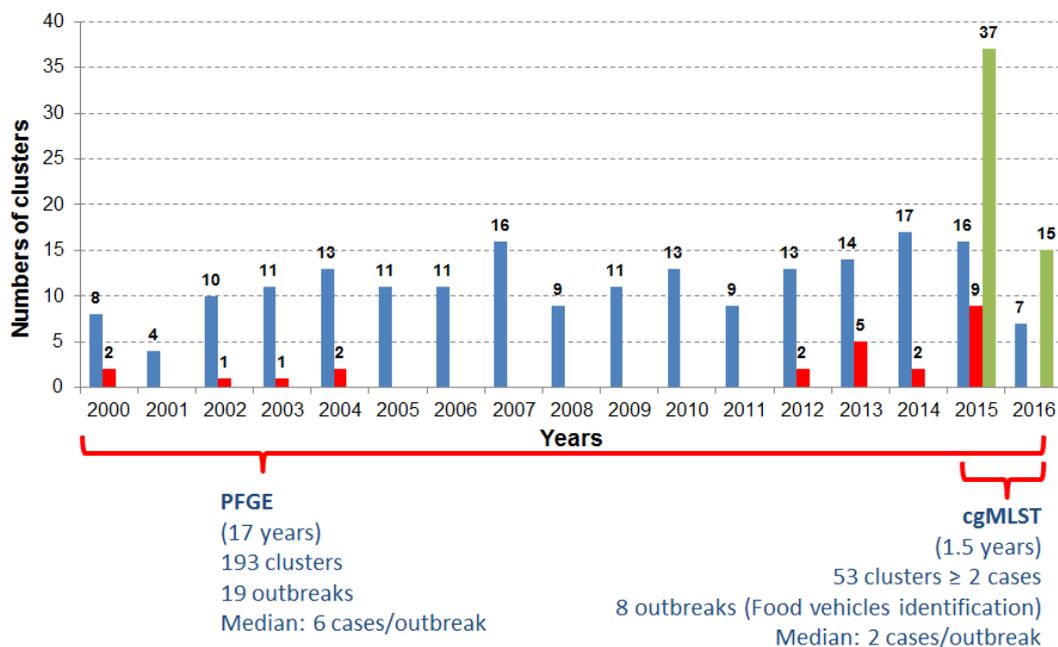
3.5. Changement majeur de la surveillance et de l'alerte : utilisation de la génomique

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.

En 2015, 16 dépassements de seuil basés sur la méthode PFGE ont été identifiés, alors que 59 clusters de souches humaines et alimentaires ont été identifiés par la méthode de cgMLST (dont 40 incluaient plus de 2 souches humaines) [14]. Cette méthode induit donc un nombre de clusters à investiguer multiplié par 2,5 par rapport au PFGE (Figure 30). Au total, 19% (3/16) des dépassements de seuil identifiés par la méthode PFGE ont abouti à l'identification de l'aliment à l'origine des cas, et 44% par la méthode de cgMLST (26/59). Cette meilleure efficacité de détection des sources alimentaires a eu, durant l'année 2015, un impact important sur la rapidité de détection des épidémies et la mise en place de mesures visant à limiter le nombre de cas. L'utilisation de cette nouvelle méthode a non seulement permis d'éviter des cas supplémentaires de listériose en France mais également permis d'éviter des investigations inutiles et onéreuses de pseudo-cas groupés identifiés de façon éronnée par 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**.

Figure 30. 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, H. De Valk, Isopol, Paris, 2016)



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.

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.

4. LISTE DES PUBLICATIONS

La liste des publications du CNRL depuis sa création est disponible et actualisée sur son site web.

4.1. Publications nationales

Mailles, A., Lecuit, M., Goulet, V., Leclercq, A., Stahl, J.P. 2011. *Listeria monocytogenes* encephalitis in France. Med Mal Infect 41:594-601.

Chaussade, H., Garot, D. Bastides, F., De Gialluly, C., Mercier, E., Gras, G., Leclercq, A., Perrotin, D. 2011. A Touraine cluster of central nervous system listeriosis. Med Mal Infect 41:613-6.

Leclercq A., Pierron, E., Ruscassie, R., le CES Microbiologie de l'ANSES. Fiche de danger : *Listeria monocytogenes*. Approuvée par l'Anses, mis en ligne en 2012 sur le site ANSES.

Charlier-Woerther, C., Lecuit, M. 2011. Infections de la mère et de l'enfant. La lettre de l'Internat.

Roussel S., Leclercq, A., Santolini, A., Agbessi, A., Chenal-Francisque, V., Lailler, R., Lecuit, M., Pihier, N., Brisabois, A. 2012. Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments. BEH Hors Série. 9 mai 2012 : 41-45.

Goulet, V., Leclercq, A., Laurent E., King, L.A., Chenal-Francisque, V., Vaillant, V., Letort, M.J., Lecuit, M., de Valk, H. 2012. Surveillance de la listériose humaine en France, 1999-2011. BEH Hors Série. 9 mai 2012 : 38-40.

Coste, J. F., Duval, V., Nguyen, Y., Guillard, T., Brasme, L., David, C., Strady, C., Lecuit, M., de Champs, C. 2012. Unusual location of a brain abscess due to *Listeria monocytogenes*. Pathol Biol 60(5):e45-8.

Le Lamer, S., I. Desforges, Leclercq, A. Octobre 2013. Le Point sur : les *Listeria*. bioMérieux Lettre de veille Normative. bioMérieux, Marcy l'Etoile.

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

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

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

Leclercq, A., Gantzer, C., Kooh, P., Gautier, M., Spinnler, H.E., CES BioHazard ANSES. 2014. Avis de l'Anses relatif à l'utilisation des phages dans les denrées alimentaires d'origine animale pour lutter contre les *Listeria*. Anses, Maisons-Alfort.

<https://www.anses.fr/fr/content/avis-de-l-anses-relatif-a-l-utilisation-des-phages-dans-les-denrees-alimentaires-d'origine>

Charlier, C., Le Mercier, D. 2015. Fièvre chez la femme enceinte. La revue du Praticien.30(953): 16-17.

4.2. Publications internationales

Chenal-Francisque, V., Lopez, J., Cantinelli, T., Caro, V., Tran, C., Leclercq, A., Lecuit, M., Brisse, S. 2011. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis.* 17:1110-2.

Hein, I., Klinger, S., Dooms, M., Flekna, G., Stessl, B., Leclercq, A., Hill, C., Allerberger, F., Wagner, M. 2011. Stress survival islet 1 (SSI-1) survey in *Listeria monocytogenes* reveals an insert common to *Listeria innocua* in sequence type 121 *L. monocytogenes* strains. *Appl Environ Microbiol.* 77:2169-73.

Lombard, B., Leclercq, A. 2011. Validation of innovative food microbiological methods according to the EN ISO 16140 standard. *Food Analytical Methods.* 4(2): 163-172.

Laciar, A. L., Vaca Ruiz, M. L., Le Monnier, A. Neonatal *Listeria*-meningitis in San Luis, Argentina: a three-case report. *Rev Argent Microbiol.* 43:45-7.

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.

Le Monnier, A., Blanot, S., Abachin, E., Beretti, J. L., Berche, P., Kayal, S. *Listeria monocytogenes*: a rare complication of ventriculoperitoneal shunt in children. *J Clin Microbiol.* 49:3924-7.

Le Monnier, A., Abachin, E., Beretti, J. L., Berche, P., Kayal, S. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis by real-time PCR for the *hly* gene. *J Clin Microbiol.* 49:3917-23.

Nikitas, G., Deschamps, C., Disson, O., Niault, T., Cossart, P., Lecuit, M. 2011. Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin. *J. Exp. Med.* 208(11):2263-77.

Yde, M., Naranjo, M., Mattheus, W., Stragier, P., Pochet, B., Beulens, K., De Schrijver, K., Van den Branden, D., Laisnez, V., Flipse, W., Leclercq, A., Lecuit, M., Dierick, K., Bertrand, S. 2012. Usefulness of the European Epidemic Intelligence Information System in the management of an outbreak of listeriosis, Belgium, 2011. *Euro Surveill* 17(38).

Farfour, E., J. Leto, M. Barritault, C. Barberis, J. Meyer, B. Dauphin, A. S. Le Guern, A. Lefleche, E. Badell, N. Guiso, A. Leclercq, A. Le Monnier, M. Lecuit, V. Rodriguez-Nava, E. Bergeron, J. Raymond, S. Vimont, E. Bille, E. Carbonnelle, H. Guet-Revillet, H. Lecuyer, J. L. Beretti, C. Vay, P. Berche, A. Ferroni, X. Nassif, and O. Join-Lambert. 2012. Evaluation of the Andromas MALDI-TOF MS system for identification of aerobically growing Gram-positive Bacilli. *J Clin Microbiol.* 50(8):2702-7.

Charlier, C., Leclercq, A., Cazenave, B., Desplaces, N., Travier, L., Cantinelli, T., Lortholary, O., Goulet, V., Le Monnier, A., Lecuit, M. 2012. *Listeria monocytogenes*-Associated Joint and Bone Infections: A Study of 43 Consecutive Cases. *Clin Infect Dis.* 54:240-8.

Archambaud, C., Nahori, M. A., Soubigou, G., Becavin, C., Laval, L., Lechat, P., Smokvina, T., Langella, P., Lecuit, M., Cossart, P. 2012. Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:16684-9.

Disson, O., Lecuit, M. 2012. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Virulence* 3:213-21.

Respaud, R., Grayo, S., Singlas, E., Dubouch, S., Le Monnier, A., Lott, M. C. 2012 High-performance liquid chromatography assay for moxifloxacin in brain tissue and plasma: validation in a pharmacokinetic study in a murine model of cerebral listeriosis. *J Anal Methods Chem.* 2012:436349.

Mailles, A., De Broucker, T., Costanzo, P., Martinez-Almoyna, L., Vaillant, V., Stahl, J.P., Bebear, C., Bernillon, P., Brouard, C., de Broucker, T., Cua, E., Dabernat, H., Floret, D., Lecuit, M., et al. 2012. Long-term outcome of patients presenting with acute infectious encephalitis of various causes in France. *Clin Infect Dis.* 54(10): 1455-64.

Travier, L., Guadagnini, S., Gouin, E., Dufour, A., Chenal-Francisque, V., Cossart, P., Olivo-Marin, J. C., Ghigo, J. M., Disson, O., Lecuit, M. 2013. ActA Promotes *Listeria monocytogenes* Aggregation, Intestinal Colonization and Carriage. PLoS Pathog. 9(1):e1003131.

Roche, S. M., Grepinet, O., Kerouanton, A., Ragon, M., Leclercq, A., Temoin, S., Schaeffer, B., Skorski, G., Mereghetti, L., Le Monnier, A., Velge, P. 2012. Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent *Listeria monocytogenes* isolates. BMC Microbiol 12:304.

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(3):1829-30.

Haase, J. K., Didelot, X., Lecuit, M., Korkeala, H., *L. monocytogenes* MLST study group (A. Leclercq, K. Grant, M. Wiedmann, P. Apfalter), Achtman, M. 2013. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study. Environ Microbiol. 16(2):405-16.

Disson, O., Lecuit, M. 2013. In vitro and in vivo models to study human listeriosis: mind the gap. Microbes Infect 15:971-80.

Tsai, Y.H., O. Disson, H. Bierne, M. Lecuit. 2013. Murinization of internalin extends its receptor repertoire, altering *Listeria monocytogenes* cell tropism and host responses. PLoS Pathog. 9(5):e1003381

Cantinelli, T., Chenal-Francisque, V., Diancourt, L., Frezal, L., Leclercq, A., Wirth, T., Lecuit, M., Brisse, S. 2013. "Epidemic Clones" of *Listeria monocytogenes* Are Widespread and Ancient Clonal Groups. J Clin Microbiol. 51(11):3770-9.

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(2):159-60

Charlier, C., Goffinet, F., Azria, E., Leclercq, A., Lecuit, M. 2013. Inadequate management of pregnancy-associated listeriosis: lessons from four case-reports. Clin Microbiol Infect. 20(3):246-9.

Zuk, J., Bazan-Socha, S., Zarychta, J., Leclercq, A., Lecuit, M., Le Flèche-Matéos, A., Orłowska-Heitzman, J., Musiał, J. 2013. Disseminated nocardiosis mimicking exacerbation of pulmonary Sarcoidosis. Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases. 30(1):65-9.

Chenal-Francisque, V., Diancourt, L., Cantinelli, T., Passet, V., Tran-Hykes, C., Bracq-Dieye, H., Leclercq, A., Pourcel, C., Lecuit, M., Brisse, S. 2013. Optimized Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Assay and Its Complementarity with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing for *Listeria monocytogenes* Clone Identification and Surveillance. J Clin Microbiol 51(6):1868-80.

Girard, D., Leclercq, A., Laurent, E., Lecuit, M., de Valk, H., Goulet, V. 2014. Pregnancy-related listeriosis in France, 1984 to 2011, with a focus on 606 cases from 1999 to 2011. Euro Surveill. 19(38). pii: 20909.

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

Charlier, C., Fevre, C., Travier, L., Cazenave, B., Bracq-Dieye, H., Podevin, J., Assomany, D., Guilbert, L., Bossard, C., Carpentier, F., Cales, V., Leclercq, A., Lecuit, M. 2014. Biliary tract listeriosis: analysis of 20 cases. Medicine. 93(18):e105. doi: 10.1097/MD.000000000000105.

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

Lebreton A, Job V, Ragon M, Le Monnier A, Dessen A, Cossart P, Bierne H. 2014. Structural basis for the inhibition of the chromatin repressor BAH1 by the bacterial nucleomodulin LntA. *mBio* 5(1):e00775-13. doi:10.1128/mBio.00775-13.

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

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

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

Blériot, C., T. Dupuis, G. Jouvion, G. Eberl, O. Disson, M. Lecuit. 2015. Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity.* 42(1):145-158.

Lecuit M., Eloit, M. 2015. The potential of whole genome NGS for infectious disease diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 7:1-3

Chenal-Francisque V., Maury M., Lavina M., Touchon M., Leclercq A., Lecuit M., Brisse S. 2015. Clonogrouping, a rapid multiplex PCR method to identify major clones of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol.* 53(10):3355-8

Bouayad, L., Hamdi, T.M., Naim, M., Leclercq A., Lecuit M. 2015. Prevalence of *Listeria* spp. and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from broilers at the abattoir. *Foodborne Pathog. Dis.* 12(7):606-11.

Gossner, C.M., de Jong, B., Hoebe, C.J., Coulombier, D.; European Food and Waterborne Diseases Study Group (Leclercq A.). 2015. Event-based surveillance of food- and waterborne diseases in Europe: urgent inquiries (outbreak alerts) during 2008 to 2013. *Euro Surveill.* 20(25):19-28.

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.

Eugster, M.R., Morax, L.S., Hüls, V.J., Huwiler, S.G., Leclercq, A., Lecuit, M., Loessner, M.J. 2015. Bacteriophage predation promotes serovar diversification in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 97(1):33-46.

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.

4.3. Communications nationales

Journée Départementale du Département Infections et Epidémiologie. Institut Pasteur, Paris. 6 Janvier 2011. Poster. V. Chenal-Francisque, J. Lopez, T. Cantinelli, V. Caro, C. Tran, A. Leclercq, M. Lecuit, and S. Brisse. Poster. "Molecular typing of *Listeria monocytogenes*: a public health and population biology perspective". Abstract P24 page 48.

Journée « La PCR dans tous ses états Agro-alimentaire – Environnement - Santé humaine et animale". ASFILAB (Association des responsables de la qualité et de la fiabilité analytique). Paris. 18 Octobre 2011. Présentation orale – A. Leclercq. Frontières des méthodes PCR en microbiologie des aliments et des eaux.

12^{ème} journée nationale d'infectiologie. Toulouse. 8-10 Juin 2011. C. Charlier-Woerther, B. Cazenave, A. Leclercq, O. Lortholary, P. Ravaud, V. Goulet, M. Lecuit. Poster. Listériose materno-néonatale : données sur les 26 premiers cas de l'étude MONALISA. Poster C-16.

Journée Départementale du Département Infections et Epidémiologie. Institut Pasteur, Paris. 27-28 Septembre 2012. Poster. V. Chenal-Francisque, L. Diancourt, T. Cantinelli, V. Passet, H. Bracq-Dieye, A. Leclercq, C. Pourcel, S. Brisse and M. Lecuit. Assessing the genetic diversity of *Listeria monocytogenes* through Multiple Locus Variable of Tandem Repeat Analysis (MLVA) - Evaluation of MLVA as a molecular subtyping method for *Listeria monocytogenes*. Abstract P16 page 62.

5^{ème} colloque du "Club des Belles souris". Institut Pasteur, Paris. 5 avril 2012. Présentation orale. M. Lecuit. Humanized mouse models for listeriosis.

Seminar series. Institut Fédératif de Recherche 48, Marseille. **13 Avril 2012.** Présentation orale. M. Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.

Seminar series. UMR 722 Inserm Universités Paris Diderot et Paris Nord, Ecologie et évolution des microorganismes, Paris. 3 Mai 2012. Présentation orale. M. Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.

Colloquium "Seeing is believing". Collège de France, Paris. 4 Juin 2012. Présentation orale. M. Lecuit. Revisiting the cell biology of *Listeria monocytogenes* infection by tissue imaging.

14^{èmes} Journées nationales d'Infectiologie, Clermont Ferrand, Juin 2013. Session Best Of. Présentation orale. Charlier, C. Actualités Infections femmes enceintes.

Journée Pathogènes alimentaires. Thermo Fisher Scientific (Oxoïd), West Events, Nantes, 24 Septembre 2013. Présentation orale. Leclercq, A. Surveillance humaine et alimentaire des *Listeria*: Bilan et perspectives sur les méthodes analytiques et les réglementations.

Journée Départementale du département Infection et Epidémiologie. Institut Pasteur, Belle Eglise, 30 Septembre et 01 Octobre 2013. Poster. Dieye, H., V. Chenal-Francisque, L. Han, A. Leclercq, M. Scotti, A. Vazquez-Boland, and M. Lecuit. Characterization of non-haemolytic *Listeria monocytogenes* isolates. Abstract P-12, page 74.

Program UE Europe "Microbial Evolution and Molecular Epidemiology". Ecole Normale Supérieure, Lyon, (2013), 23 Janvier 2013. Oral. Lecuit, M. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.

SFR Biosciences Gerland Seminar Series, Lyon, 18 Février 2013. Présentation orale. Lecuit, M. *Listeria monocytogenes* and the intestinal barrier: invasion and host responses.

Seminar series, Inserm U 1002. Institut Necker & Necker-Enfants malades Medical School, Paris, 20 mars 2013. Présentation orale. Lecuit, M. *Listeria monocytogenes* crossing of the intestinal barrier: *invasion and host responses*.

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

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

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

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

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

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

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

16^e Journées Nationales d'infectiologie, Nancy, Juin 2015. C. Charlier, S. Poirée, C. Delavaud, G. Khoury, C. Richaud, A. Leclercq, M. Lecuit. Poster. **Imagerie cérébrale de la neurolistériose : série prospective de 71 dossiers neuroradiologiques.** Poster COL01-02.

Department Infection and Epidemiology Annual Retreat, Chaumont-en-Vexin, 2015. Moura A, Pouseele H, Maury M, Touchon M, Chenal-Francisque V, Dieye H, Cantinelli T, Leclercq A, Jones L, Criscuolo A, Larsonneur E, Tarr C, Carleton H, Kucerova Z, Katz L, Stroika S, Larsson J, Reimer A, Walker M, Nadon C, Nielsen E, Dallman T, Grant K, Gerner-Smidt P, Pot B, Lecuit M, Brisse S. Poster. **A fast and universal typing method for research and surveillance of *Listeria monocytogenes* based in whole-genome sequencing.**

Journée des CNRS, INVS, Paris, Novembre 2015. S. Brisse. Présentation Orale. **Genomic epidemiology of bacterial pathogens.**

4.4. Communications internationales

5th Workshops of the NRLs for *Listeria monocytogenes*. 10-11 Mars 2011. Paris. Marc Lecuit et Sylvain Brisse. « Recent trends in human Listeriosis ».

6th Workshops of the NRLs for *Listeria monocytogenes*. 28-30 Mars 2012. Maisons-Alfort. Marc Lecuit et Sylvain Brisse. « *Listeria monocytogenes* clonal diversity: everything is everywhere, so let's talk the same language».

6th Workshops of the NRLs for *Listeria monocytogenes*. 28-30 Mars 2012. Maisons-Alfort. Marc Lecuit et Viviane Chenal Francisque. « MLVA evaluation as a subtyping method for *Listeria monocytogenes* ».

Symposium "Real time analysis of host-pathogen interactions", 112th American Society for Microbiology (ASM) General Meeting. 19 Juin 2012. San Francisco, CA / USA. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of the intestinal barrier: *in vivo* imaging of a silent invasion.

Spetses summer school on pathogen-host-interactions of major animal infectious diseases and zoonoses. 10 Septembre 2012. Spetses Island, Greece. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.

11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 15 Septembre 2012. Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji City, Hyogo, Japan. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes*, a silent invader.

European congress of Clinical Microbiology and Infectious diseases. International Congress Centre Berlin, Berlin, Allemagne, 27-30 Avril 2013. Poster. Charlier, C., B. Cazenave, A. Leclercq, J. Podevin, D. Assomany, L. Guilbert, and M. Lecuit. 2013. *Listeria monocytogenes*-associated biliary tract infections: analysis of 18 cases. Abstract P2102 page 171.

European congress of Clinical Microbiology and Infectious diseases. International Congress Centre Berlin, Berlin, Allemagne, 27-30 Avril 2013. Poster. Shoai-Tehrani, M., A. Leclercq, M. Lecuit, C. Charlier, on behalf of the endovascular listeriosis study group. 2013. Endovascular listeriosis: a series of 12 consecutive cases. Abstract P2098 page 171.

ISOPOL (International Symposium on Problems of Listeriosis). 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Dieye, H., V. Chenal-Francisque, L. Han, A. Leclercq, M. Scortti, A. Vazquez-Boland, and M. Lecuit. Characterization of non-haemolytic *Listeria monocytogenes* isolates. Abstract P/BIO/08 page 50.

ISOPOL (International Symposium on Problems of Listeriosis). 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Pezzuto, A. I. Drigo, A. Piovesana, C. Bacchin, D. Comin, A. Leclercq, A. Morvan, A. Cereser, and M. Fravetti. *Listeria monocytogenes* in fresh and seasoned homemade salami: serotype prevalence. Abstract P/DS/06 page 83.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Roussel, S., V. Chenal-Francisque, G. Pontdeme, M. Lecuit, S. Brisse, and A. Brisabois. Genetic diversity of major clones of *Listeria monocytogenes* from food sources. Abstract P/DS/08 page 86.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. A. Leclercq, V. Cadet-Daniel, A. Morvan, T. Cantinelli, V. Chenal-Francisque, and M. Lecuit. Does *Listeria monocytogenes* serovar 4ab exist? Abstract P/DS/09 page 87.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Chenal-Francisque, V., L. Diancourt, T. Cantinelli, V. Passet, C. Tran-Hykes, H. Bracq-Dieye, A. Leclercq, C. Pourcel, M. Lecuit, and S. Brisse. An optimized MLVA assay for *Listeria monocytogenes* clone identification and surveillance. Abstract P/DS/11 page 89.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Leclercq, A., V. cadet-Daniel, H. Dieye, A. Morvan, T. Cantinelli, V. Chenal-Francisque, and M. lecuit. Improvement of listeriosis surveillance by adding *Sma*I to *Listeria monocytogenes* *Ascl/Apal* PFGE subtyping. Abstract P/DS/12 page 90.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Poster. Leclercq, A., S. Roussel, J. Santolini, A. Agbessi, V. Chenal-Francisque, R. Lailler, M. lecuit, N. Pihier, and A. Brisabois. French surveillance of *Listeria monocytogenes* in food from 2006 to 2011. Abstract P/PC/10 page 215.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Communication orale. Dieye, H., O. Disson, A. Leclercq, V. Chenal-Francisque, and M. Lecuit. Febrile and septicemic gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. Abstract O/EPI/02 page 157.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Communication orale. Charlier, C., A. Leclercq, V. Goulet, O. Lortholary, P. Ravaut, and M. Lecuit. MONALISA: Multicentric observational national analysis on listeriosis and *Listeria*. Abstract O/EPI/03 page 158.

10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM-10). Institut Pasteur, Paris, France. Poster. Chenal-Francisque, V., L. Diancourt, T. Cantinelli, V. Passet, C. Tran-Hykes, H. Bracq-Dieye, A. Leclercq, C. Pourcel, M. Lecuit, and S. Brisse. An optimized MLVA assay for *Listeria monocytogenes* clone identification and surveillance. Poster 225.

Présentation sur les épidémies de *Listeria*, European *Listeria* typing Exercise (ELITE) meeting. ECDC, Stockholm, 28-29 Novembre 2013. Leclercq, A., V. Chenal-Francisque, M. Lecuit, M. Tourdjmann, E. Laurent, H. de Valk, S. Salah, and N. Pihier. Detection of a listeriosis cluster of cases linked to cheese (France, 2013).

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

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

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

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

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

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

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

France – Japan Immunology meeting, Cassis, France. 22-23/10/14. [M. Lecuit](#). Présentation Orale. *Listeria* invasion of host tissues.

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

World Sepsis Day, Institut Pasteur, 12/09/14. [M. Lecuit](#). Présentation Orale. Interest of animal models.

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

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

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

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

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

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

25th ECCMID, Copenhagen, April 2015. C. Charlier, S. Poirée, G. Khoury, C. Delavaud, C. Richaud, A. Leclercq, M. Lecuit. Présentation Orale. Neuroradiology imaging in neurolisteriosis: a prospective series from 71 patients.

SFB 914 “Trafficking of Immune Cells in Inflammation, Development and Disease” Seminar Series, München, Mai 2015. M. Lecuit. Présentation Orale. *Listeria monocytogenes* invasion of host tissues.

4th workshop ‘Rapid NGS for clinical, Public Health, and food Microbiology’, Münster, Allemagne, 11-13 Mars 2015. S. Brisse. Présentation Orale. *cgMLST analysis of Listeria monocytogenes*.

Gordon Research Conference, Infections of the nervous system, pathogenesis and worldwide impact, Hong Kong (2015), 14-19 Juin. M. Lecuit. Présentation Orale. Clinical, microbiological and pathophysiological insights on neurolisteriosis,

Immunology and Infection Department Seminars, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, 7 Octobre 2015. M. Lecuit. Présentation Orale. *Listeria monocytogenes* invasion of host tissues.

4.5. Conférences sur invitations

Séminaire du Centre pour l'Infection & Immunologie de Lille. 11 Octobre 2011. Lille. Marc Lecuit. « *Listeria monocytogenes*, a silent invader ».

GABBA Module in Microbiology and Infection. 19 Janvier 2011. Porto, Portugal. Marc Lecuit. Microbes and host barriers.

***Listeria monocytogenes*, an expert barrier breaker**. 17 Janvier 2011. Department of Infectious Diseases and Pathobiology seminar series, University of Bern, Switzerland. Marc Lecuit.

FDA/USDA/CDC sponsored *Listeria monocytogenes* dose-response Workshop Pathophysiology of listeriosis. 17-18 Mars 2011. Arlington, USA. Marc Lecuit.

International workshop on Intestinal mucosal homeostasis and disease. 23-24 Mars 2011. Hannover, Germany. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes*, a silent invader.

Symposium "The intestine, a cell signaling paradigm". *Listeria monocytogenes* breaching of the intestinal epithelium. Marc Lecuit. 25 Mars 2011. Collège de France, Paris, France.

Department of Microbiology seminar series. Peking University, Beijing, China. 6 Avril 2011. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.

2nd Conference on "Microbiology: Pathogens and Host Response" *Listeria monocytogenes*, a silent invader. Marc Lecuit. Hebrew University of Jerusalem, Israel. 10-13 Mai 2011.

1st Eranet pathogenomics Listress meeting. Giessen, Germany. 27 Mai 2011. Marc Lecuit. Animal models for gastrointestinal listeriosis.

Seminar series, Departments of Environmental health science, Infectious diseases, Microbiology and the Biomedical Health Science Institute, University of Georgia, Athens, GA, USA. 20 Juin 2011. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.

Seminar series, Division of biological and biomedical sciences. Emory University, Atlanta, USA. 22 Juin 2011. Marc Lecuit. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers.

Microbial Pathogenesis & Host Response, Cold Spring Harbour Meeting, Cold Spring Harbour, NY, USA. 15 Septembre 2011. Marc Lecuit. Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin.

Seminar series. *Listeria monocytogenes*, a silent invader. Institut Pasteur de Lille, Lille. 11 Octobre 2011. Marc Lecuit.

Systems biology and genomic medicine Today Symposium. Infection and Immunity: beyond the future in the control of infectious disease. 18 Octobre 2011. Institut Pasteur, Paris, France. Marc Lecuit. Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin.

Seminar series. *Listeria monocytogenes* crossing of host barriers. Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Toulouse, France. 23 Novembre 2011. Marc Lecuit.

Séminaire du Centre pour l'Infection & Immunologie de Lille. 11 Octobre 2011. Lille. Marc Lecuit. « *Listeria monocytogenes*, a silent invader ».

10th European Initiative for Basic Research in Microbiology and Infectious Diseases, Max Planck Institute for Infection Biology. Berlin / Saint Maximin la Ste Baume, 2-4/10/13. M. Lecuit. *Listeria monocytogenes* interactions with the intestinal barrier.

A Day on Infection associated Diseases. Braunschweig, 21/11/13. M. Lecuit. *Listeria monocytogenes* invasion of host tissues.

23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Symposium Pathogenesis of infections due to intracellular bacteria. Berlin, Germany, 27-30/04/13. M. Lecuit. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*.

ISOPOL. 2013. Goa (India). 19-22 Septembre 2013. Communication orale. Lecuit, M. *Listeria monocytogenes* crossing of the intestinal barrier and within-host dissemination. Abstract PI 7/A page 8.

Eranet pathogenomics Listress meeting. Madrid, Spain, 13/04/13. M. Lecuit. Murinization of internalin extends its receptor repertoire, altering *Listeria monocytogenes* cell tropism and host responses.

ESCMID postgraduate course, Intracellular Bacteria: From Biology to Clinic. Villars-sur-Ollon, Switzerland, 26-30 Aout 2013. M. Lecuit. Clinical listeriosis.

ESCMID postgraduate course, Intracellular Bacteria: From Biology to Clinic. Villars-sur-Ollon, Switzerland, 26-30 Aout 2013. M. Lecuit. *Listeria* pathogenesis

ESCMID postgraduate course, Intracellular Bacteria: From Biology to Clinic. Villars-sur-Ollon, Switzerland, 26-30 Aout 2013. M. Lecuit. *Listeria* genomics.

Journée Worldwide Food Science. Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, 26 Septembre 2013. Leclercq, A. *Listeria monocytogenes*; *Listeria spp.* Representative collection of the population diversity? Needs and targets.

Invitation Afnor Validation domaine agroalimentaire. Afnor, La Plaine Stade de France, 06 Mai 2013. Leclercq, A. *Listeria monocytogenes*, *Listeria spp.* Collection représentative de la diversité ? Définition des besoins.

Formation continue « Pathogènes alimentaires », ADRIA Développement de Quimper, Rennes, 25/09/14. A. Leclercq. : *Listeria monocytogenes*.

Alpa, Institut Pasteur de Lille, Lille, 04/06/14. A. Leclercq. Formation continue «*Listeria* : Bactériologie, Epidémiologie et pouvoir Pathogène des *Listeria* », cycle « Micro-organismes pathogènes et aliments ».

Séminaire pour le staff de Microbiologie, Hôpital Necker Enfants Malades, AP-HP, Paris, 2014. C. Charlier-Woerther Malades sur « MONALISA ».

Séminaire pour le staff d'Obstétrique, Hôpital Cochin Port Royal, AP-HP, Paris, 2014. C. Charlier-Woerther. « Actualités Listériose »

Séminaire pour le staff de Maladies Infectieuses, Hôpital Bichat Claude Bernard, AP-HP, Paris, 2014, C. Charlier-Woerther. « MONALISA »

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

Seminar series, Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, Février 2015. M. Lecuit. How *Listeria* makes its way into the host.

BioMérieux Research and Development, Marcy l'Etoile, France, 20 Septembre 2016. A. Leclercq. Présentation Orale. Nouvelles espèces de *Listeria* et diversité des *L. monocytogenes*.

Séminaire d'Epidémiologie moléculaire appliquée à la surveillance et au contrôle des maladies infectieuses, Labex IBEID, Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice, France, Mars 2015. M. Lecuit. Identification et découverte de pathogènes par le séquençage à haut débit.

Séminaire d'Immunologie, Hématologie et de Rhumatologie Pédiatriques Pierre Royer, Institut Imagine, Paris, France. 27 Mars 2015. Lecuit. Next Generation Sequencing-based pathogen discovery in immunodeficient patients.

Séance du CES BIOHAZARD, ANSES, Maisons-Alfort, 06 Novembre 2015. A. Leclercq. Présentation orale. **WGS et *Listeria***.

4.6. Chapitres de livres

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

Doran, K., Baerjee, A., Disson, O., Lecuit, M. 2012. Crossing host barriers, Bacterial Pathogens: Concepts/Mechanisms. **Bacterial Pathogenesis**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Editor P Cossart, S Maloy, 2012.

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

Charlier, C., Lecuit, M. Fiches e-POPI *Micrococcus*, *Listeria*, *Fusarium*, *Geotrichum* et *Malassezia*.

Leclercq, A., Oevermann, A., Danguy-des-Déserts, R., Granier, S., Hammack, T., Jinneman, K., Chen, Y., Rathbone, R., Riegler, G. ***Listeria monocytogenes***. Chapitre 2.9.7. In OIE Terrestrial Manual. World Organization for Animal Health (OIE), Paris, 2014.

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

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

Leclercq A., Hardouin H., Lombard, B. 2015. Chapter 5 - CEN/ISO standards for both culture and molecular methods. In Molecular Microbial Diagnostic Methods: Pathways to Implementation for the Food and Water Industries, Elsevier - Academic Press, Nigel Cook, Martin D'Agostino, K. Clive Thompson (eds), pp.79-106

Leclercq, A. 2015. ***Listeria monocytogenes***, Chapitre 4. p. 74-94 In D. Drider and G. Salvat (ed.), Sécurité Sanitaire des Aliments : Epidémiologie et moyens de luttés contre les principaux contaminants zoonotiques des aliments. Economica, Paris.

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

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), In Press.

4.7. Interactions avec la presse

Tournage d'un reportage pour la chaîne NRJ12 pour la série « **Les énigmes de la médecine** » : *Listeria* et listériose.

Formation continue infirmière : Interview pour « le Journal de l'infirmière Libérale ». Charlier, C. Journal de l'infirmière libérale, décembre 2013.

Mystères de la science biomédicale. Institut Pasteur, Paris, 12 Février 2013. M. Lecuit. ***Listeria monocytogenes* : des aliments au cerveau**.

4.8. Contributions ou collaborations avec des instances nationales et internationales

4.8.1. Santé Publique France

Le CNRL est en lien hebdomadaire avec SPF pour la surveillance nationale et journalière concernant les suivis de dossiers de souches humaines ou d'investigations.

De plus, le CNRL a interagi avec SPF à plusieurs reprises dans le but de collaborer ou de communiquer sur les nouvelles méthodes développées au CNRL :

- En 2014 et 2015, le CNRL a collaboré avec SPF au sujet du remplacement de la PFGE par le cgMLST.
- En 2015, Monsieur L. COLLET, Président de l'INVS/SPF, a visité le CNRL et a pu mesurer les avantages du cgMLST comme nouvelle méthode de typage utilisée pour la surveillance par le CNRL.
- En Janvier 2016, le Comité des CNRs a également visité le CNRL et a discuté du rôle des CNRs dans la constitution les banques de données de spectrométrie de masse Maldi-Tof et de la surveillance génomique des *Listeria*.

Le CNRL a participé à 2 rapports d'investigation rédigés par SPF sur des épidémies (disponibles sur <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Listeriose/Publications>) :

- Tourdjman, M., Leroux, B., Leclercq, A., Laurent, E., Chenal-Francisque, V., King, L., *et al.* 2014. Épidémie d'infections à *Listeria monocytogenes* liée à la consommation de brie au lait cru – France, 2012. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire. 15 p.
- Tourdjman, M., Donguy, M.P., Leclercq, A., Fredriksen, N., Remonnay, J., Chenal-Francisque, V. *et al.* 2016. Épidémie d'infections à *Listeria monocytogenes* dans l'est de la France, 2014. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire. 8 p.

4.8.2. ANSES et LNR des *Listeria monocytogenes*

Le CNRL a des interactions régulières avec le LNRL de l'ANSES:

- Dans le cadre d'un accord validé en 2008 par la cellule *Listeria*, un échange régulier de souches d'alertes-produits et de profils PFGE entre le LNRL et le CNRL a été mis en place grâce à des bases compatibles. Ces échanges de profils permettent d'augmenter l'exhaustivité de la collecte de souches alimentaires pour la surveillance nationale. Le CNRL et le LNRL, appuis techniques de la cellule *Listeria*, investiguent donc ensemble des sources possibles de contamination et peuvent être amenés ensemble à expertiser des méthodes analytiques à la demande de la DGAI.
- Le CNRL participe, avec le LNRL, à l'examen de saisines DGS/DGCCRF/DGAI en tant qu'expert pour le CES « Evaluation des risques biologiques des aliments » de l'ANSES.
- Le CNRL échange également avec les investigateurs en charge de la surveillance de la résistance aux antibiotiques des *Lm* d'origine alimentaire et animale du LNRL [50].
- Le CNRL participe à la rédaction et à la mise à jour de la fiche de danger « *Listeria* » de l'ANSES.
- Un projet transversal de recherche sur la période 2010-2012 a été mené en collaboration entre le CNRL, la Plate forme de santé publique PF8 de l'Institut Pasteur et le LNRL. Ce projet, intitulé « *Phylogenetic structure and genomics of major clones of Listeria monocytogenes from clinical and food origins* », a donné lieu à une publication sur la biodiversité des *Lm* en 2016 [13].

4.8.3. ANSM

Le CNRL a participé en mai 2014 à la rédaction de recommandations sur l'isolement de *Lm* dans les selles, d'après la méthode qu'il a développée (« La transplantation de microbiote fécal et son encadrement dans les essais cliniques », http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/5e5e01018303790194275ded0e02353c.pdf).

En 2014-2015, le CNRL a participé au programme de réactovigilance de l'ANSM, qui portait sur les réactifs analytiques. Les actions du CNRL consistaient à répondre aux LABM demandeurs d'informations et à informer les autorités

compétentes des impacts que peut avoir une mauvaise gestion de ces réactifs sur la surveillance microbiologique nationale (ex. : mauvaise identification phénotypique de souches de *Lm*).

Le CNRL est également un appui technique au Contrôle Qualité National de l'ANSM, lorsqu'il porte sur *Listeria*, et à ce titre il renseigne les laboratoires correspondants en cas de difficultés

4.8.4. DGS, DGAI et DGCCRF

Le CNRL, dans le cadre de sa mission de surveillance microbiologique hebdomadaire pour la cellule *Listeria*, est en lien constant avec la DGS, la DGAI et la DGCCRF. Outre la gestion des alertes-produits nationales ou du réseau RASFF de l'Union Européenne et des enquêtes sur les formes neuroméningées, des avis techniques lui sont demandés, tant au niveau central que décentralisé ou auprès d'homologues étrangers. Le CNRL participe à des réunions coordonnées par la DGS dans le cadre de la gestion d'alertes, de cas groupés ou d'épidémies.

De même, dans le cadre de la gestion des mouvements ou rassemblements de population, le CNRL a été mobilisé par SPF et la DGS dans le cadre du dispositif de veille et de surveillance dédiés aux jeux olympiques en 2012 (Villages de sportifs en France) et à l'EUFA Euro2016.

4.8.5. Laboratoire Communautaire de Référence (EURL) des *Listeria monocytogenes* et DG SANTE

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 LNRI. Ses missions consistent à l'analyse de l'antibiorésistance des souches zoonotiques et la mise au point de méthodes d'essais dans le domaine alimentaire et vétérinaire pour la détection, l'énumération et la caractérisation des *Lm*.

A plusieurs reprises, l'EURL a invité le CNRL à présenter ses travaux lors de la journée des LNR, en présence de la DG SANTE:

- en mars 2011 : exposé présenté par M. Lecuit et S. Brisse sur la structure des populations déduite par MLST, intitulé « *Listeria* strain : Typing and population biology, a mutually beneficial interaction ».
- en mars 2012 : deux exposés, l'un présenté par S. Brisse sur « *Listeria monocytogenes* clonal diversity : Everything is everywhere, so let's talk the same language » et l'autre par V. Chenal-Francisque sur « MLVA evaluation as a subtyping method for *Listeria monocytogenes* ».

En 2014, dans le cadre de la révision de la norme ISO 11290 sur la détection des *Listeria* dans la chaîne alimentaire, l'EU-RL a invité A. Leclercq à faire un point sur « La taxonomie des *Listeria* : update, impact sur les méthodes, la validation et le futur ».

De plus, le CNRL et l'EURL ont mené des projets de recherche communs, dont :

- un projet qui a commencé en 2014 sur les performances des méthodes de détection/énumération des *Listeria* spp. utilisées en microbiologie alimentaire pour détecter les nouvelles espèces de *Listeria* ;
- un projet réalisé à la demande de la DG SANTE sur la caractérisation de souches ayant contaminé un produit à risque : le beurre [51].

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.

4.8.6. European Center for Diseases Control: ECDC

Le CNRL participe activement au groupe de travail *Listeria* du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire (FWD) et au « Workshop on whole-genome sequencing for food and waterborne pathogens » de l'ECDC, avec la participation de M. Lecuit ou A. Leclercq en tant qu'experts.

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 participe aux enquêtes de l'ECDC, comme une enquête de 2015 portant sur son activité et les méthodes employées pour la surveillance microbiologique des *Listeria* en France.

En novembre 2013, en collaboration avec SPF et la DGAI, le CNRL a présenté au FWD-ECDC un exposé sur « Detection of a listeriosis cluster of cases linked to cheese – France-2013 ». Cet exposé a permis de définir le terme « cluster » et les notions de « fréquence des profils PFGE » et de « circulation des clones MLST » en France.

Le CNRL participe annuellement à la révision des rapports conjoints annuels EFSA-ECDC sur les zoonoses (EU Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks, Annual epidemiological report- Food and waterborne diseases and zoonoses, External quality assessment scheme for *Listeria monocytogenes* typing). Il a également contribué à une revue dans Eurosurveillance, en collaboration avec C. Gossner de l'ECDC. Cette revue traitait des « Urgent inquiries » survenues en Europe entre 2008 et 2012 et concernant les maladies d'origine hydrique ou alimentaire [52]. Il a également contribué au cahier des charges « Listeriosis » pour l'Atlas sur les maladies infectieuses de l'ECDC (<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&FixDataset=1>).

4.8.7. Autorité Européenne de sécurité des Aliments: 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 ».

4.8.8. Center for Disease Control and PulseNet

En février 2013, le CNRL a été invité par le réseau PulseNet International du CDC à sa 4^{ème} réunion stratégique concernant le passage de la PFGE aux nouvelles méthodes de typage par WGS.

Suite au rapprochement entre les systèmes de surveillance des *Listeria* français (CNRL/CCOMS et SPF) et américain (CDC d'Atlanta), le CNRL/CCOMS a organisé une réunion en Juin 2014 à laquelle ont assisté des membres de SPF et

du CDC d'Atlanta (Dr Peter Gerner-Smidt, microbiologiste, et Dr John BESSER, épidémiologiste). Le but était de comparer les systèmes de surveillance actuels à ceux envisagés avec le WGS, en tenant compte des premières comparaisons PFGE/WGS aux USA et de l'outil cgMLST développé au CNRL. Depuis, le CNRL et SPF reçoivent chaque année un représentant du CDC dans le cadre de ces échanges, comme G. Besser en 2015.

4.8.9. Agence de la Santé Publique du Canada

En Octobre 2011, le CNRL a reçu M.W. Gilmour, Directeur du Programme des maladies entériques du Laboratoire National de Microbiologie de l'Agence de la Santé publique du Canada. L'objectif était de discuter des collaborations possibles en recherche, et également de lui faire connaître le système de surveillance français, ainsi que le fonctionnement du CNRL.

De plus, le CNRL a validé sa méthode de cgMLST en partenariat avec l'Agence de la Santé publique du Canada et participe avec elle à un programme de recherche sur un nouveau kit de diagnostic immunologique.

4.8.10. Organisation Internationale de Normalisation (ISO) et Comité Européen de Normalisation (CEN)

En 2011-2015, le CNRL a participé, avec le LNRI, aux réunions Afnor V08B, CEN TC275/WG6 et ISO TC34/SC9 sur la révision des méthodes EN ISO 11290 de détection et d'énumération des *Lm* dans la chaîne alimentaire et a actualisé le schéma d'identification des souches de *Listeria* spp. Le CNRL a également participé aux réunions du groupe de travail *Listeria* du mandat M381 de la Commission Européenne pour la validation des méthodes EN ISO 11290. Il participe également au développement de la norme NF EN ISO 16140-6 sur la validation des méthodes microbiologiques de confirmation (identification, sérotypage, typage moléculaire).

4.8.11. Office International des Epizooties (OIE)

De 2011 à 2014, le CNRL a coordonné, avec d'autres experts, la révision du chapitre sur *Lm* dans le Manuel terrestre de l'OIE

(http://wahis2-devt.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf).

4.8.12. EC Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)

Le réseau RASFF de l'Union européenne est un outil d'échange d'informations sur les mesures prises pour garantir la sécurité alimentaire : les notifications d'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. La participation du CNRL à ce système est décrite dans le chapitre 3.4.5. et en annexe B.

4.8.13. Centre Collaborateur OMS (CCOMS)

L'Unité de Biologie des Infections est 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. 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.

5. DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE QUALITE

Le Management de la Qualité est important dans le cadre des activités d'expertise du CNRL. Il garantit la fiabilité des résultats vis-à-vis des laboratoires qui adressent spontanément leurs souches au CNRL pour leur identification et leur caractérisation. Outre le management de la qualité, l'établissement des documents qualité et leur application permet une traçabilité totale des essais réalisés au CNRL, ce qui constitue un atout en cas de problème juridique ou de saisie des documents techniques dans le cadre d'une procédure juridique. Enfin, ils assurent un système de codification et d'anonymisation des échantillons et des données des patients pour en assurer la confidentialité et la protection, en complément des procédures de l'infrastructure informatique visant au traitement automatisé des données à caractère personnel.

Contexte général

L'Institut Pasteur a la volonté de répondre aux bonnes pratiques dans ses domaines d'intervention mais également aux exigences réglementaires auxquels il est soumis. Il faut rappeler ici qu'étant donné les conditions particulières liées aux missions et au fonctionnement des CNR, la Direction Générale de la Santé a accordé, sous certaines conditions, une dérogation aux CNR sur les points suivants :

- o La déclaration à l'Agence régionale de Santé (ARS), non demandée aux CNR ;
- o Le maintien des prérogatives des responsables et des responsables adjoints non biologistes ;
- o Les conditions pré-analytiques, les CNR n'effectuant pas de prélèvement(s).
- o La signature d'une convention de « sous-traitance » avec les laboratoires correspondants, dont les CNR sont dispensés.

Les CNR placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur ont, depuis 1996, entrepris une démarche qualité s'appuyant sur le GBEA. Enfin, en application des dispositions de l'ordonnance du 13 janvier 2010, ratifiée par la loi 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale, l'Institut Pasteur s'est engagé depuis 2013 dans une démarche d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189. Les actions sont réparties en actions spécifiques au sein de chaque CNR, en actions des fonctions support et des différentes directions.

Actions spécifiques dans chaque CNR

Chaque CNR a un correspondant qualité qui anime la démarche qualité en collaboration avec l'ingénieur Qualité du Service Qualité – Environnement et Développement durable de l'Institut Pasteur. Chaque CNR s'assure des compétences du personnel par des parcours d'intégration et d'habilitation des différents personnels, avec suivi du maintien des compétences. Chaque CNR rédige les procédures et les modes opératoires spécifiques et en assure la gestion documentaire, de même qu'il assure la gestion de son matériel avec planning de maintenance et suivi métrologique. Le matériel critique est spécifiquement identifié.

Actions des fonctions support

- o La **DRTE**, certifiée ISO 9001 depuis 2011, apporte notamment les ressources humaines (ingénieurs qualité) assurant l'accompagnement qualité et le pilotage du Système de Management de la Qualité du LREMS. Elle met également à disposition des laboratoires du LREMS :
 - o Son laboratoire de métrologie fonctionnant selon les exigences de la norme NF EN ISO 17025,
 - o D'autres services moins spécifiquement associés à la démarche qualité (gestion des déchets, entretien des locaux, maintenance des bâtiments...). Le service Qualité – Environnement – Développement durable (QEDD) est en charge de rédiger et d'assurer la gestion documentaire de toutes les procédures transversales via la plateforme de partage sécurisée Webcampus. Le service QEDD a formé les différents CNR à l'utilisation du logiciel KALILAB qui permet de gérer les non-conformités, les réclamations et les actions d'amélioration.
- o La **CCR** assure la mise à jour du site web pour tous les CNR. Les informations utiles, concernant notamment les conditions pré-analytiques, l'acheminement des prélèvements / souches, le rendu des résultats, la revue de contrat sont disponibles sur les pages web des CNR (site Institut Pasteur) (<http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-referance>).

Le LREMS a déposé son dossier d'accréditation dans les délais recommandés par l'ordonnance du 10 janvier 2010 et les dispositions du COFRAC (novembre 2012). Le LREMS de l'Institut Pasteur s'engage à être accrédité selon la norme ISO 15189 sur les périmètres suivants :

- 50 % des examens de biologie médicale avant le 1^{er} novembre 2016
- 70% des examens de biologie médicale avant le 1^{er} novembre 2018
- 100% des examens de biologie médicale avant le 1^{er} novembre 2020

Chaque année, le LREMS étend son périmètre d'accréditation, et ajoute des techniques dans son champ d'accréditation afin d'être accrédité pour 100% des examens qu'il réalise conformément aux délais réglementaires. Les moyens mis en place et l'investissement des équipes des CNR ainsi que des services supports de l'Institut Pasteur ont permis au LREMS d'être accrédité pour au moins 50% de son volume d'activité avant les délais imposés par les conditions de la loi 2013-442 du 30 mai 2013.

Un manuel Qualité permet de présenter le contexte et les moyens mis en œuvre pour le bon fonctionnement du LREMS.

Etat d'avancement du projet d'accréditation du LREMS

Octobre 2013 : audit COFRAC, avec accréditation obtenue en mars 2014 pour les CNR :

- CNR de la Leptospirose
- CNR de la Rage
- CNR des Virus Influenzae
- CNR de la Coqueluche et autres Bordetelloses
- CNR des Corynébactéries du complexe *Diphtheriae*
- Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence

Janvier 2015, audit de suivi et d'extension COFRAC avec accréditation obtenue en avril 2015 :

- Pour le CNR des Hantavirus
- et maintien de l'accréditation pour les CNR audités en octobre 2013

Juin 2015, audit de renouvellement et d'extension COFRAC avec accréditation obtenue en octobre 2015, maintien de l'accréditation pour les CNR cités précédemment et extension obtenue pour les CNR suivants :

- CNR des Listeria
- CNR des Mycoses Invasives et Antifongiques
- CNR de la Peste et autres Yersinioses
- CNR des Anaérobies,
- CNR des Fièvres Hémorragiques Virales
- CNR des Méningocoques

L'attestation d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC à l'adresse suivante :
<https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>

Au 1^{er} trimestre 2016, une demande d'extension a été déposée au COFRAC afin d'ajouter le CNR des Papillomavirus, le CNR des *Escherichia coli Shigella*, *Salmonella* et le CNR des Vibrions et du Cholera dans le périmètre d'accréditation du LREMS (en attente d'information de la part du COFRAC concernant la période d'audit).

Ces CNR sont accompagnés dans leur démarche qualité par le service QEDD. Leur système qualité ainsi que les techniques d'analyse qu'ils proposent à l'accréditation sont soumis à des audits internes (juin, juillet 2016 pour la majorité et d'autres planifiés pour septembre-octobre 2016). Ces CNR ont effectué leur propre revue de qualité (revue de direction locale) et ont participé à la revue de direction du LREMS. L'audit de surveillance COFRAC du LREMS, pour les CNR déjà accrédités, devrait avoir lieu au dernier trimestre 2016.

Contexte particulier

Programme concernant le CNR des *Listeria*

Le CNRL a intégré la 3^{ème} vague d'accréditation du LREMS de Juin 2015. 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 personnel du CNRL. Ce système est conforme aux normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 17025. Le correspondant qualité est A. Leclercq.

Voici la liste des faits marquants survenus de 2014 à 2016 :

1. Revues qualité LRE-MS du CNR *Listeria* : 06 Mars 2014
2. Revue de direction LRE-MS : 8 Avril 2014
3. Finalisation dossier de validation de méthode de Génosérotypage: Octobre 2014
4. Audit interne CNR *Listeria* : Octobre 2014
5. Audit COFRAC LRE-MS: Janvier 2015
6. Envoi du dossier de validation de méthode dossier de validation de méthode groupage PCR : Mars 2015
7. Evaluation COFRAC LRE-MS dont CNR *Listeria* (Méthode Groupage PCR) : Juin 2015
8. Obtention de l'accréditation en Octobre 2015
9. Audit interne technique : Décembre 2015
10. Audit interne qualité : Janvier 2016
11. Revue qualité LRE-MS du CNR *Listeria* : 30 Mars 2016
12. Revue de direction LRE-MS : 23 Mai 2016
13. Préparation des dossiers de validations des méthodes Maldi-Tof et génomique cgMLST : Janvier-Mai 2016
14. Evaluation COFRAC LRE-MS programmée en Novembre 2016
15. Extension de la portée d'accréditation (Méthode Maldi-Tof MS) : 2017
16. 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 calendrier des futures demandes d'accréditation de méthodes est présenté dans le tableau 21.

Tableau 21. 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

Le CNRL participe aux essais d'intercomparaisons (EQA) entre les CNRs européens organisés par le Statens Serum Institute (Danemark) pour l'ECDC. Le but est de vérifier que tous les CNRs participants génèrent des résultats d'analyses similaires à partir d'un même échantillon, ce qui est une condition essentielle pour que des échanges de données entre CNRs puissent avoir lieu. Une campagne d'essais d'aptitude a lieu annuellement en Septembre-Octobre sur le sérotypage classique, le génosérotypage et la PFGE avec les enzymes *Ascl*/*Apal*. Pour les EQA depuis 2013, CNRL a obtenu les résultats présentés dans le Tableau 22, ainsi que le certificat de réussite associé.

Tableau 22. Résultats du CNRL à l'EQA de l'EURL puis de l'ECDC de 2012 à 2015

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)
Nombre de laboratoires participants	33	18	18	18	18
Nombre de souches testées	10	10	10	11	11
Identification <i>Lm</i>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Scores sérotypage classique	ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Scores sérotypage moléculaire	ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Qualité Gel PFGE	<i>Ascl</i>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
	<i>Apal</i>				
Analyse gel PFGE Bionumerics	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

Enquête satisfaction client

En 2014, le CNRL a envoyé une enquête de satisfaction clients à 272 laboratoires (81% de LABM et 19% de laboratoires de Microbiologie Alimentaire). Les questions posées sont listées dans le tableau 23. 73 (27%) laboratoires ont donné une note comprise entre 3 et 3,5 sur 4. D'après les réponses obtenues 54% des laboratoires font appel au CNRL pour son support technique et ses conseils, et pour 41% 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 2016.

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 CNRL peut compter sur les services de l'un des correspondants hygiène et sécurité de l'Institut Pasteur (P. Thouvenot). Ce personnel veille au respect quotidien des réglementations en termes d'hygiène, de biosécurité et de biosûreté au sein du CNRL.

Tableau 23. Résultats de l'enquête satisfaction client 2014

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

6. DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

6.1. Système Informatique de Laboratoire

L'ensemble des données épidémioclinico-microbiologiques collectées pour chaque souche est rassemblé dans le Système Informatique du Laboratoire (SIL) des CNR. Ce SIL, nommé Lagon, est en conformité avec les exigences réglementaires et normatives actuelles et une veille sur ces derniers points assure son actualisation. Il s'agit de la conformité aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 d'accréditation des laboratoires d'analyses médicales qui s'applique aux CNR.

Ce SIL est protégé par 2 niveaux de mots de passe individuels et se situe sur un serveur interne protégé dédié de l'Institut Pasteur. Une journalisation des connexions est effectuée. Le poste informatique se verrouille automatiquement après 10 minutes d'inactivité. Les données sont échangées en réseau sous forme chiffrée. Les données sont sauvegardées quotidiennement de façon centralisée et automatisée. Le fonctionnement du CNRL est conforme au GBUI (Guide de Bonne Utilisation de l'Informatique). L'ensemble des prestataires de service internes et externes ont signé des clauses de confidentialité et respectent les réglementations pour la gestion des matériels ou données de santé publique.

6.2. Gestion des données

Le système informatique et de gestion des données, ainsi que le respect des réglementations afférentes du CNRL sont annuellement évalués par nos audits internes et l'évaluation COFRAC, car il s'agit d'une exigence de la norme d'accréditation NF EN ISO 15189 et des documents spécifiques du COFRAC.

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

Les CNR de l'Institut Pasteur utilisent les applications (Lagon, Voozoo) développés par la société EpiConcept.

[A - Lagon](#)

Cas général - Application

Lagon v2 est une application dont l'architecture se base sur un modèle à plusieurs niveaux où l'on retrouve :

- Un client lourd (lagon.exe) commun à l'ensemble des CNR ;
- Une base de données elle aussi commune à l'ensemble des CNR (lagon) ;
- Une base de données propre à chaque CNR.

Les données propres à chaque CNR sont systématiquement localisées dans la base propre du CNR. Cette base est logiquement cloisonnée par rapport aux autres. La base propre au CNR contient :

- Les données (données administratives, d'analyses mais également base d'archivage des impressions) ;
- Les ressources (gabarits de compte-rendu, structures de données, structures d'écran, ...). Les ressources sont, pour tout ou partie, adaptables aux besoins des CNR mais peuvent être mutualisées au besoin (liste de consultation de structure commune par exemple). Les versions successives des ressources sont conservées dans le temps ainsi que les données relatives aux modifications. L'architecture repose également sur une ressource centrale décrivant les analyses disponibles au CNR.

L'intérêt majeur de cette architecture réside dans le fait que, de ce fichier central, peuvent être déduits à la fois les structures de base de données, les écrans de saisie mais également les éléments importants dans le contrôle du workflow appelés « profils ». La majorité des opérations sont effectuées sans besoin de modification du noyau « client lourd ». Les mécanismes assurant la traçabilité sur l'ensemble des analyses sont également rendus possibles et

automatisés grâce à cette architecture. On peut ainsi suivre la validation des analyses de manière fine (qui, quand, quoi).

D'autre part, cette architecture logicielle a été conçue pour permettre de délocaliser les bases de données sur différents serveurs.

Lagon est protégé par 2 niveaux de mots de passe individuels et se situe sur un serveur interne protégé et dédié de l'Institut Pasteur. Une fermeture automatique de l'application a lieu après 15 minutes d'inactivité du poste. Les données sont sauvegardées quotidiennement de façon centralisée et automatisée. Le fonctionnement de Lagon au sein des CNR est conforme au GBUI. Le fonctionnement de Lagon est conforme au GBUI (Guide de Bonne Utilisation de l'Informatique). L'ensemble des prestataires de service internes et externes ont signé des clauses de confidentialité et respectent les réglementations pour la gestion des matériels ou données de santé publique.

Lagon v3 repose également sur les mêmes principes d'architecture concernant les structures de données. En revanche, il se base sur une plateforme commune, Voozadoo, utilisée sur plusieurs centaines de systèmes d'informations du domaine de la santé publique. Cette version simplifie et normalise un certain nombre de processus et rend la solution indépendante du système d'exploitation. Elle est envisagée pour la prochaine mandature.

Cas général - Serveur

Le serveur de base de données (MySQL) repose sur une machine dédiée à l'application et mutualisée entre les différents CNR. Cette machine a été renouvelée au premier semestre 2016.

Cas particulier du CNR des Listeria

Le logiciel LAGON est utilisé depuis le 1er janvier 2005. Il permet

- la gestion en temps réel des échantillons (suivi administratif, enregistrements des résultats techniques, etc.),
- l'anonymisation des données et leur archivage.

Il est compatible avec d'autres logiciels, comme Bionumerics 6.6 (Applied Maths, Belgique), utilisé pour l'analyse et le stockage des profils de macrorestriction et de données de génomique.

B - Voozadoo

Cas général – Application

Voozadoo est une plateforme de conception de système d'information développée par la société EpiConcept. Dans le cadre des CNR, son utilisation est polymorphe et peut couvrir :

- Des systèmes de surveillance centralisés ;
- Des systèmes de déclaration et d'envoi de souche ;
- Des systèmes de suivi d'études cliniques.

L'application, distribuée sous licence libre, est entièrement basée sur des technologies web et facilite ainsi l'accès à de nombreux partenaires extérieurs (aucune installation requise, seulement un navigateur et une connexion internet). D'architecture modulaire, Voozadoo permet de couvrir les besoins principaux en matière de traitement d'information dans le domaine de la santé publique :

- Collecte multisource (poste fixe, dispositifs mobiles, sources externes de données...) ;
- Traitements statistiques (module d'analyse basé sur R <https://cran.r-project.org/>);
- Production de sorties standardisées multiformat ;
- Transferts de fichiers sécurisés ;
- Analyse cartographique ;
- Outils de conception.

Une journalisation des connexions est effectuée. Une fermeture automatique de la session a lieu après une période d'inactivité paramétrable en fonction du CNR. Les données sont échangées en réseau sous forme chiffrée.

Cas général - Serveur

L'ensemble des applications développées sous Voozanoo pour les CNR est hébergé sur les serveurs d'EpiConcept qui dispose de l'agrément hébergeur de données de santé à caractère personnel². Cet agrément est délivré par l'ASIP.

L'ASIP Santé gouverne aujourd'hui tout le paysage des systèmes d'informations en santé et impose des règles en matière de sécurité, de confidentialité et d'interopérabilité qui vont avoir à courts termes des conséquences non négligeables sur les outils informatiques utilisés par les CNR.

La PSSI d'EpiConcept (Politique de Sécurité des Systèmes d'Information) est disponible sur demande.

Cas particulier du CNR des Listeria

Voozanoo est actuellement utilisé au CNRL dans le cadre de l'étude MONALISA et d'études dérivées.

C - Lagon et Voozanoo – Sécurité & Interopérabilité

Chiffrement des échanges

Les échanges de données Voozanoo sur le web sont chiffrés via TLS 1.0 et conformément à la déclaration faite dans le cadre de l'agrément d'hébergement de données de santé à caractère personnel.

Droits des utilisateurs / Restriction des accès

Une interface dédiée permet l'association d'actions et de droits à des groupes d'utilisateurs (personnel administratif, technicien, biologiste, administrateurs...).

D'autre part, Lagon est interconnecté avec l'annuaire de l'Institut Pasteur (LDAP). Chaque personne ayant accès à Lagon doit être référencée et active dans cet annuaire. La gestion de l'identifiant et du mot de passe s'en trouve ainsi centralisée et commune.

Interopérabilité avec des automates de laboratoire

Plusieurs interfaces ont été mises en place à façon pour faciliter l'intégration des données en provenance d'automates de laboratoires directement dans Lagon. Un projet de middleware est en cours d'étude sous Lagon v3 pour étendre la famille des automates supportés.

Interopérabilité avec Bionumerics

De nouvelles fonctionnalités ont été apportées à Lagon pour le rendre compatible avec Bionumerics (Applied Maths, Belgique), logiciel permettant l'analyse et le stockage des profils de macrorestriction.

Les fonctionnalités développées permettent à Lagon d'exporter des données de type épidémiologiques (lieu, date) mais également quelques données de résultats d'analyses, évitant ainsi une double saisie.

Dématérialisation des résultats

Un module dédié à la dématérialisation des résultats est en cours de conception. Ce module doit être développé en plusieurs phases :

Phase 1, Notification du laboratoire expéditeur et mise à disposition des résultats : suivant la logique déjà présente dans les laboratoires et modélisée sous Lagon, le module de dématérialisation permettra au CNR de notifier le laboratoire expéditeur de la bonne réception de l'échantillon dans un premier temps suivi, dans un second temps, de la mise à disposition du résultat associé et accessible via un code d'accès unique et à durée d'utilisation limitée. La mise en place de ce module est prévue d'ici la fin 2016.

² <http://esante.gouv.fr/services/referentiels/securite/hebergeurs-agrees>

Phase 2, Cycle complet de déclaration, d'envoi d'échantillon et de retrait de résultat : afin de consolider l'identification des échantillons, il est prévu de donner aux laboratoires la possibilité de déclarer leurs échantillons en amont de l'envoi au CNR. Cette procédure permettra :

- D'attribuer un identifiant unique à tout échantillon envoyé ;
- De saisir les données associées sur un formulaire adapté aux besoins du CNR ;
- D'envoyer, si possible, l'échantillon de façon totalement anonyme ;
- De suivre l'échantillon de façon univoque.

L'acceptabilité de ce module passe par la mise en place d'une convention de preuve entre le CNR et chacun des laboratoires.

6.2.2. Gestion des données de caractérisation/typage des souches

Infrastructure

Pour les analyses de séquences à haut débit, l'infrastructure de calcul de l'Institut Pasteur est mise à disposition de la plateforme de PIBnet. Elle comprend un cluster de calcul de haute performance avec un total de 3120 processeurs (Intel Xeon) sur des machines ayant des mémoires vives (RAM) allant de 64 à 512 Go. Un ensemble de 16 machines, soit 192 processeurs, est dédié aux analyses PIBnet afin d'assurer une priorisation des analyses nécessaires à la surveillance et aux urgences de santé publique

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 plus de 17.600 entrées de souches, environ 44.000 profils de macrorestriction et 3.200 profils cgMLST. De plus, différentes informations y sont disponibles pour chaque souche, dont leur numéro, leur origine, leur numéro d'alerte-produit (s'il en existe un), leur pays d'isolement, leur niveau de sensibilité/résistance aux antibiotiques, ainsi que des remarques techniques sur les souches.

Grâce à cette base de données, le CNRL a partiellement automatisé la comparaison des profils PFGE. Une des missions du cahier des charges du CNRL consiste à automatiser complètement l'étape de comparaison des souches à partir de résultats de typage, ce qui est bien adapté à la nouvelle méthode de typage utilisée au CNRL : le cgMLST. Dans ce sens, le CNRL est en contact permanent avec la firme Applied Maths, afin d'améliorer la qualité de sa base et celle de la surveillance.

6.2.3. 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.

6.2.4. Grands axes de développement

Pour Lagon, les principaux axes de développement sont : développement d'un module d'envoi des rapports d'essais et d'enregistrements des échantillons/souches en ligne par attribution d'un identifiant et d'un code d'accès aux laboratoires correspondants.

Pour BioNumerics, le principal axe de développement sera d'implémenter la version la plus récente du logiciel 7.6 versus 6.6 actuellement (cette version 7.6 contient le module permettant l'analyse des données de génomes et comparaison des souches par cgMLST).

Les données concernant des souches anciennes sont actuellement entreposées dans un fichier excel. Il est prévu de les transférer dans un logiciel de management de collections adopté par la plateforme PIBnet, qui permet une gestion sous management de la qualité. Le but ici est de disposer d'une base unique contenant toutes les données sur les souches que possède le CNRL, tout en respectant ses engagements CNIL.

6.3. Procédures visant au respect de la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractère personnel.

Aspects techniques

L'ensemble des procédures existantes énumérées ci-dessous vise au respect de la conformité à la réglementation relative au traitement automatisé des données à caractères personnel ou les évolutions prévues et font parties de la déclaration CNIL.

- Authentification: nativement, l'authentification est individuelle (personne physique) et elle s'effectue par le biais de la saisie d'un identifiant et d'un mot de passe associé. En fonction des infrastructures, elle peut être renforcée par l'utilisation d'un LDAP (Système d'annuaire centralisé). Une interface d'administration permet à l'administrateur de gérer l'ensemble des utilisateurs (révocation, changement de mot de passe, création, etc.);
- Droits des utilisateurs / Restriction des accès : une interface dédiée permet l'association d'actions et de droits à des groupes d'utilisateurs (personnel administratif, technicien, biologiste, administrateurs...);
- Traçabilité;
- Journalisation des accès;
- Traçabilité de toutes les actions sur la base de données du type (QUI/QUOI/QUAND);
- Traçabilité des modifications effectuées sur le logiciel et les ressources (versionning);
- Télémaintenance : A la demande du CNR, des opérations de télémaintenance peuvent avoir lieu sur les serveurs de base de données. Elles sont effectuées par tunnel sécurisé (ssh) via les comptes dédiés des personnels autorisés de la société EpiConcept. Chaque opération est journalisée;
- Sauvegarde et restauration : L'hébergement et la sauvegarde des serveurs Lagon centralisés sont assurés par les services informatiques de l'Institut Pasteur. En dehors d'indication particulière, ceux-ci sont sauvegardés avec une procédure classique : dump quotidien des bases MySQL ; sauvegarde complète une fois par mois conservée 1 mois ; sauvegarde différentielle une fois par jour, conservée 3 mois. Le serveur est sauvegardé en une fois, pour tous les CNRs hébergés. La sauvegarde se fait sur bande magnétique (LTO5) dans des locaux indépendants et sécurisés pour assurer une conservation des données en cas d'incident majeur. La sauvegarde se fait via le logiciel "Symantec NetBackupEnterprise Server 6.5". L'hébergement et la sauvegarde des données Voozoo sont assurés par EpiConcept dans le cadre d'un contrat. La PSSI d'EpiConcept, disponible sur demande, décrit tous ces processus.

Aspects réglementaires

Dans le cadre de leur activité de participation au soin, d'expertise et de surveillance épidémiologiques, les CNR de l'Institut Pasteur destinataires de données à caractère personnel de santé satisfont aux exigences de loi Informatique et Liberté du 6 janvier 19678, modifiée par la loi du 6 août 2004, et au Règlement 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016.

En 2011, conformément aux dispositions de la loi du 6 juillet 1978 dite « Informatique et Libertés », l'Institut Pasteur a déclaré à la Commission Nationale de l'Informatique et des Liberté (CNIL) les traitements de données à caractère personnel ayant été mis en œuvre par chaque CNR dans le cadre de leurs activités de surveillance et d'expertise. En annexe C de ce dossier se trouve le récépissé de déclaration normale du CNR des *Listeria*. Des mises à jour ont ensuite été sollicitées. Chaque CNR dispose d'un numéro de déclaration. Sur chaque fiche de renseignements clinico-épidémiologiques est indiquée une mention faisant référence aux dispositions de la loi Informatique et Liberté (droit d'accès et de rectification). La déclaration comporte l'engagement que le traitement satisfait aux exigences de la loi, notamment en ce qui concerne les droits des personnes.

De plus, les échantillons et données collectées sont susceptibles d'être utilisés à des fins de recherche (utilisation secondaire). Les CNR n'étant pas en contact direct avec les patients, un courrier a été adressé à l'ensemble des correspondants, intégrant une affiche permettant d'informer les patients (+ droit d'opposition).

En complément de leurs activités de surveillance et d'expertise, les CNR ont également une activité de recherche dont l'objectif est de faire progresser les connaissances sur les maladies infectieuses et notamment sur les microorganismes qui y sont associés et la mise au point / l'optimisation d'outils de diagnostic, d'identification/caractérisation des souches ... Dans le cadre de ces activités de recherche, les CNR respectent les dispositions du chapitre IX de la loi Informatique et Liberté du 6 janvier 1967, modifiée par la loi du 6 août 2004, relatif aux traitements de données à caractère personnel ayant pour finalité la recherche dans le domaine de la santé, qui autorise, sous certaines conditions, les transmissions de données médicales nominatives entre professionnels de santé et organismes de recherche tout en définissant les droits des personnes concernées. En application de ces dispositions, un avis du Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé (CCTIRS) et une autorisation CNIL sont requis et ont été obtenus par les CNR hébergés à l'Institut Pasteur.

6.4. Site internet Pages web CNR

Les pages web des CNR sont présentes sur le site de l'Institut Pasteur dans la rubrique Santé :

<http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-referance>

Sont mentionnées des informations générales dans les grands chapitres suivants :

- Les CNR
- Accès direct aux fiches de renseignements
- Envoi de matériel biologique
- Management de la Qualité
- Historique
- Missions
- Organisation
- Coordination des Centres de Référence

Le chapitre « Les CNR » comprend tous les CNR placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur avec pour chaque entité ses spécificités présentées dans les rubriques suivantes :

- Missions
- Activités
- Envoyer un échantillon/une souche
- Rapports d'activité
- La maladie - Recommandations

L'architecture a été pensée et renseignée pour être en cohérence avec les éléments qui doivent impérativement apparaître dans le cadre des obligations de la norme NF EN ISO 15189 à laquelle les CNR et la CIBU sont assujetties (loi du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale). Les correspondants peuvent ainsi accéder plus aisément aux informations utiles pour l'envoi de matériel biologique aux CNR.

Par ailleurs, les CNR sont également présents dans la rubrique « Recherche » du site de l'Institut Pasteur : <https://research.pasteur.fr/fr/referance-centers/> qui présente plus spécifiquement les thématiques et programmes de recherche en liens avec les activités de référence.

7. REFERENCES

1. Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L, Salmaso S: **An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes***. *N Engl J Med* 2000, **342**(17):1236-1241.
2. Dalton CB, Austin CC, Sobel J, Hayes PS, Bibb WF, Graves LM, Swaminathan B, Proctor ME, Griffin PM: **An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk**. *N Engl J Med* 1997, **336**(2):100-105.
3. Ooi ST, Lorber B: **Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes***. *Clin Infect Dis* 2005, **40**(9):1327-1332.
4. Gilchrist M: **Cutaneous *Listeria* infection**. *Br J Hosp Med (Lond)* 2009, **70**(11):659.
5. Charlier C, Leclercq A, Cazenave B, Desplaces N, Travier L, Cantinelli T, Lortholary O, Goulet V, Le Monnier A, Lecuit M: ***Listeria monocytogenes*-associated joint and bone infections: a study of 43 consecutive cases**. *Clin Infect Dis* 2013, **54**(2):240-248.
6. Charlier C, Fevre C, Travier L, Cazenave B, Bracq-Dieye H, Podevin J, Assomany D, Guilbert L, Bossard C, Carpentier F et al: ***Listeria monocytogenes*-associated biliary tract infections: a study of 12 consecutive cases and review**. *Medicine (Baltimore)* 2014, **93**(18):e105.
7. Anonyme: **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> 2015.
8. Ivanek R, Grohn YT, Tauer LW, Wiedmann M: **The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures**. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004, **44**(7-8):513-523.
9. Goulet V, Leclercq A, Laurent E, King, L.A., Chenal-Francisque, V., Vaillant, V., Letort, M.J., Lecuit, M., H. de Valk. : **Surveillance de la listériose humaine en France, 1999-2011**. *Bull Epidemiol Bebdom* 2012, **Hors Série. 9 mai 2012**.:38-40.
10. Goulet V, Leclercq A, Vaillant V, Le Monnier A, Laurent E, Thierry-Bled F, Pihier N, De Valk H: **Recrudescence récente des cas de listériose en France**. *Bull Epidemiol Bebdom* 2008, **30-31**:268-272.
11. 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**(11):1073-1082.
12. Leclercq A, Charlier C, Lecuit M: **Global burden of listeriosis: the tip of the iceberg**. *Lancet Infect Dis*, **14**(11):1027-1028.
13. Maury MM, Tsai YH, Charlier C, Touchon M, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Criscuolo A, Gaultier C, Roussel S, Brisabois A et al: **Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity**. *Nat Genet* 2016, **48**(3):308-313.
14. Moura A, Criscuolo A, Pouseele A, Maury MM, Leclercq A, Tarr C, Björkman JT, Dallman T, Reimer A, Enouf V et al: **Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes***. *Nature Microbiology* 2016:in press.
15. Leclercq A, Le Monnier A: ***Listeria monocytogenes***. In: *Référentiel en microbiologie médicale (REMIC)*. Edited by Microbiologie SFd, vol. 5.2. Paris, France; 2015: 527-532.
16. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P: **Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR**. *J Clin Microbiol* 2004, **42**(8):3819-3822.
17. Leclercq A, Chenal-Francisque V, Dieye H, Cantinelli T, Drali R, Brisse S, Lecuit M: **Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1**. *Int J Food Microbiol* 2011, **147**(1):74-77.
18. 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**(3):1829-1830.
19. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Herve-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, Courvalin P, Le Monnier A: **Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France**. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(6):2728-2731.
20. Graves LM, Swaminathan B: **PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis**. *Int J Food Microbiol* 2001, **65**(1-2):55-62.
21. 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**(3):293-298.
22. Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, Brisse S: **A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution**. *PLoS Pathog* 2008, **4**(9):e1000146.

23. Chenal-Francisque V, Maury MM, Lavina M, Touchon M, Leclercq A, Lecuit M, Brisse S: **Clonogrouping, a Rapid Multiplex PCR Method for Identification of Major Clones of *Listeria monocytogenes***. *J Clin Microbiol* 2015, **53**(10):3355-3358.
24. Haase JK, Didelot X, Lecuit M, Korkeala H, Achtman M: **The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study**. *Environ Microbiol* 2013, **16**(2):405-416.
25. Haase JK, Murphy RA, Choudhury KR, Achtman M: **Revival of Seeliger's historical 'Special *Listeria* Culture Collection'**. *Environ Microbiol*, **13**(12):3163-3171.
26. 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**(6):1110-1112.
27. Orsi RH, Wiedmann M: **Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016, **100**(12):5273-5287.
28. Roussel S., Leclercq A, Santolini A, Agbessi A, Chenal-Francisque, V. L, R. L, M., , Pihier N, Brisabois A: **Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments**. . *Bull Epidemiol Bebdom* 2012, **Hors série. 9 mai 2012**:41-45.
29. Tourdjman M, Laurent E, Leclercq A: **Listériose humaine : une zoonose d'origine alimentaire**. *Revue Francophone des Laboratoires* 2014, **464**:37-44.
30. Française R: **Arrêté du 16 juin 2016 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles**. In. Edited by JORF, vol. n°0141; 18 juin 2016
31. Farfour E, Leto J, Barritault M, Barberis C, Meyer J, Dauphin B, Le Guern AS, Lefleche A, Badell E, Guiso N et al: **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**(8):2702-2707.
32. Goulet V, Hebert M, Hedberg C, Laurent E, Vaillant V, De Valk H, Desenclos JC: **Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis**. *Clin Infect Dis* 2012, **54**(5):652-660.
33. Hof H, Nichterlein T, Kretschmar M: **Management of listeriosis**. *Clin Microbiol Rev* 1997, **10**(2):345-357.
34. Pouillot R, Hoelzer K, Jackson KA, Henao OL, Silk BJ: **Relative risk of listeriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites according to age, pregnancy, and ethnicity**. *Clin Infect Dis* 2012, **54 Suppl 5**:S405-410.
35. Khen BK, Lynch OA, Carroll J, McDowell DA, Duffy G: **Occurrence, Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* in the Beef Chain in the Republic of Ireland**. *Zoonoses Public Health* 2014.
36. Hof H: **Chemotherapy of *Listeria* infections**. *GMS Infectious diseases* 2013, **1**:1-10.
37. Charlier-Woerther C, Leclercq A, Lortholary O, Lecuit M: **[Listeriosis, a rare but severe foodborne infection]**. *Rev Prat* 2009, **59**(7):905-911.
38. Anonyme: **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* 2007(L 322):0012 - 0029.
39. Angelidis AS, Kalamaki MS, Georgiadou SS: **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* 2015, **193**:114-129.
40. 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**(10):e76835.
41. Cotter PD, Draper LA, Lawton EM, Daly KM, Groeger DS, Casey PG, Ross RP, Hill C: **Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes***. *PLoS Pathog* 2008, **4**(9):e1000144.
42. Disson O, Grayo S, Huillet E, Nikitas G, Langa-Vives F, Dussurget O, Ragon M, Le Monnier A, Babinet C, Cossart P et al: **Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis**. *Nature* 2008, **455**(7216):1114-1118.
43. Jacquet C, Doumith M, Gordon JI, Martin PM, Cossart P, Lecuit M: **A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes***. *J Infect Dis* 2004, **189**(11):2094-2100.
44. Lecuit M, Nelson DM, Smith SD, Khun H, Huerre M, Vacher-Lavenu MC, Gordon JI, Cossart P: **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* 2004, **101**(16):6152-6157.
45. Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, Babinet C, Cossart P: **A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier**. *Science* 2001, **292**(5522):1722-1725.
46. Lazarus C, Leclercq A, Lecuit M, Vaillant V, Coignard B, Blanchard H, Novakova I, Astagneau P: **Probable nosocomial transmission of listeriosis in neonates**. *J Hosp Infect* 2013, **85**(2):159-160.

47. Tourdjman M, Leclercq A, Groleau C, Soyer L, Moura A, Laurent E, Donguy MP, Conan G, Legoff D, Brisse S et al: **Hospital-Acquired listeriosis outbreak linked to prolonged contamination of a hospital kitchen environment - France, 2013**. In: *International Symposium on Problems of Listeriosis (ISOPOL) XIX: 2016; Paris, France*.
48. Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, de Valk H: **Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries**. *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(5):734-740.
49. Richard S, Oggioni C, Jacquet C, Laurent E, Lequerrec F, Quelquejeu N, Goulet V: **Investigations autour de cas de listériose neuroméningée: bilan de 1è mois de fonctionnement**. *Bull Epidemiol Hebdom* 2004, **9**:35-36.
50. Granier SA, Moubareck C, Colaneri C, Lemire A, Roussel S, Dao TT, Courvalin P, Brisabois A: **Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period**. *Appl Environ Microbiol*, **77**(8):2788-2790.
51. Michelon D, Leclercq A, Garric G, Guillier L, Beaufort A, Bergis H: **Growth potential assessment of *Listeria* in milk fat products by challenge testing**. *Journal of Food Safety* 2016, **36**:260-270.
52. Gossner CM, de Jong B, Hoebe CJ, Coulombier D, European F, Waterborne Diseases Study G: **Event-based surveillance of food- and waterborne diseases in Europe: urgent inquiries (outbreak alerts) during 2008 to 2013**. *Euro Surveill* 2015, **20**(25):19-28.
53. Preussel K, Milde-Busch A, Schmich P, Wetzstein M, Stark K, Werber D: **Risk Factors for Sporadic Non-Pregnancy Associated Listeriosis in Germany-Immunocompromised Patients and Frequently Consumed Ready-To-Eat Products**. *PLoS One* 2015, **10**(11):e0142986.
54. FAO, OMS: **Exemple de la cellule "Listeria"**. In: *Conférence paneuropéenne sur la sécurité sanitaire et la qualité des aliments, document de séance de la délégation française; Budapest, Hongrie. 2002*.
55. Anonyme: **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**. In: *Official Journal of the European Union*. 2008: 46-90.
56. Anonyme: **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* 2002(L31):1-24.
57. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H: **What is the incubation period for listeriosis?** *BMC Infect Dis* 2013, **13**:11.

ANNEXE B

LA SURVEILLANCE FRANÇAISE DE LA LISTERIOSE

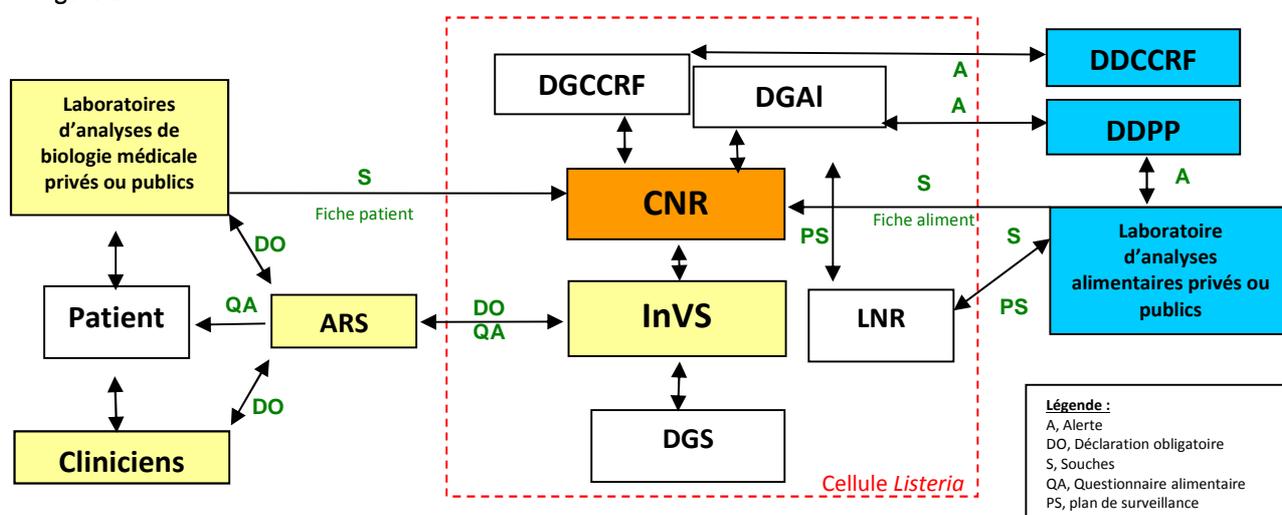
Les systèmes de surveillance de la listériose

Surveillance de la listériose humaine en France

La Direction Générale de la Santé (DGS) a mis en place depuis 1982 un système de surveillance, comprenant initialement le Centre National de Référence des *Listeria* (CNRL) localisé initialement à la Faculté de Médecine de Nantes auquel a été adjoint en 1990 le CNRL pour la lysotypie et le typage moléculaire situé à l'Institut Pasteur. Depuis la fermeture du CNR de Nantes en juillet 1993, le Centre National de Référence des *Listeria* a été hébergé par le Laboratoire des *Listeria* puis le Groupe Microorganismes et barrières de l'hôte puis l'Unité de Biologie des Infections à l'Institut Pasteur.

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 31) [54]. Cette surveillance s'effectue en lien avec l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), la Direction Générale de la Santé (DGS), la Direction Générale de l'Alimentation (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*, qui compte aussi depuis 2007 le Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* (LNR) situé au laboratoire de Santé animale de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES-LSA). Le fonctionnement de cette entité est formalisé depuis janvier 2004 par la « Procédure relative au fonctionnement de la Cellule *Listeria* chargée de la coordination des investigations et des actions autour de cas groupés de listériose ». Les missions de la cellule sont (i) la détection des cas groupés de listériose, (ii) la proposition et la coordination des investigations et actions à mettre en œuvre devant des cas groupés potentiellement liés à une source commune de contamination, (iii) leur gestion et leur prévention.

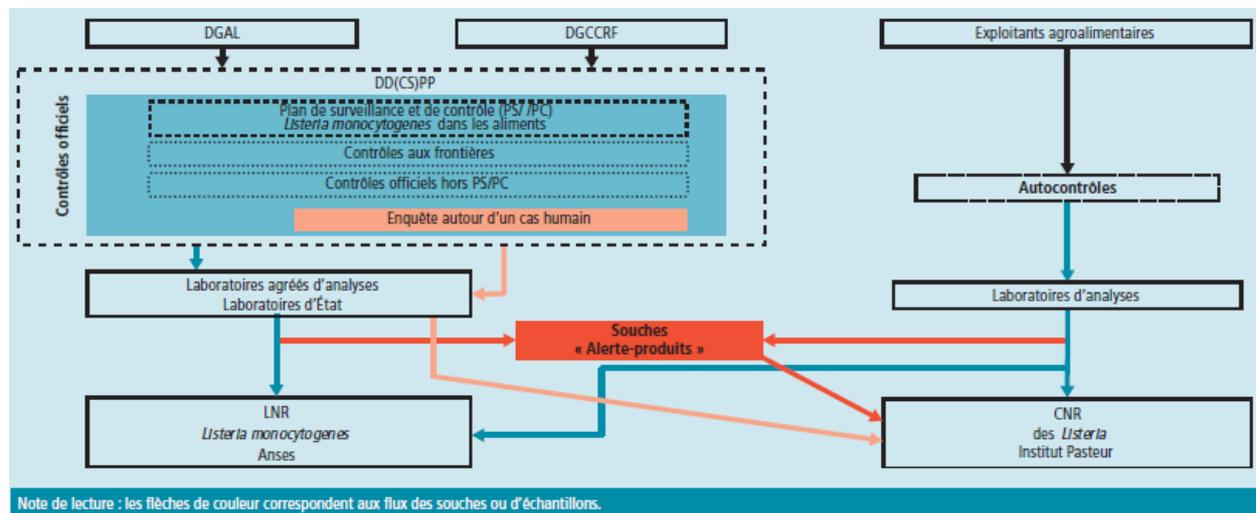
Figure 31. Schéma de fonctionnement de la cellule *Listeria*



CNR : Centre national de Référence des *Listeria* ; LNR : Laboratoire National de référence ; InVS : Institut de Veille Sanitaire ; 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 présenté à la Figure 32.

Figure 32. Circuit des souches sur le schéma de surveillance microbiologique français des *Listeria monocytogenes* (Source : BEH. 2012. Surveillance des *L. monocytogenes* dans les aliments. Hors Série : 41-45 [28])



SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN FRANCE

Le diagnostic de listériose repose sur l'isolement de *Lm* à partir d'un prélèvement biologique physiologiquement stérile ou de prélèvements périnataux.

La surveillance effectuée par le CNRL se fonde sur la caractérisation des souches isolées de patients et adressées volontairement par les biologistes, en parallèle à la déclaration obligatoire envoyée à l'ARS. Les cas diagnostiqués par une autre technique (biologie moléculaire ou sérologie) ne sont à ce jour pas retenus dans le cadre de la DO [55], car ces méthodes n'ont pas été formellement validées. La PCR *hly* est cependant très spécifique et peut constituer une aide diagnostic pour le clinicien, notamment dans les formes neuroméningées. Ce n'est pas le cas des tests sérologiques qui ne sont plus recommandés par le référentiel en Microbiologie (REMIC) depuis 2015 [15]. Le CNRL caractérise également les souches alimentaires et environnementales qui lui sont adressées dans le cadre du système de surveillance.

L'activité de surveillance du CNRL consiste à :

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

Ces éléments permettent :

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

SURVEILLANCE ET DEPASSEMENT DE SEUIL

Plusieurs étapes successives d'alerte sont définies jusqu'en 2016 de la façon suivante puisque ce schéma d'alerte va évoluer vers l'analyse génomique cgMLST en remplacement de la macrorestriction d'ADN (PFGE):

1. Définition de profil rare, fréquent et endémique :

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

2. Dépassement de seuil (« cas groupés »)

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

3. Surveillance renforcée

Tout dépassement de seuil est suivi d'une phase de surveillance renforcée durant laquelle le CNRL signale toute nouvelle souche d'origine humaine ou alimentaire similaire à celle du dépassement de seuil, tandis que l'InVS conduit les questionnaires alimentaires et les enquêtes épidémiologiques appropriées. La Cellule *Listeria* décide au vu des résultats de ces investigations des actions à mettre en œuvre: analyse des informations disponibles (résultats des contrôles, retraits de produits), demande de transmission au CNRL de souches isolées à la production ou à la distribution, identification des marques commercialisant les produits contaminés, prélèvements dans les magasins où s'approvisionnent les patients, enquêtes dans des établissements de production, etc. La phase de surveillance renforcée est close lorsque plus aucun nouveau cas dû à une souche avec des caractéristiques microbiologiques identiques à celle du dépassement de seuil n'est détecté pendant 6 semaines. Le CNRL informe alors la Cellule *Listeria* de la clôture du dépassement de seuil et ne signale plus, sauf avis contraire de la cellule *Listeria*, les cas humains avec une souche identique.

4. la phase d'Alerte

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

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

5. Cas sporadiques, groupés et épidémies

Une épidémie correspond à un excès de cas de listériose, liés à une souche définie, le plus souvent en rapport avec une exposition précise, identifiée ou non. La déclaration d'épidémie est décidée par la Cellule *Listeria*, et tient compte de la distribution des cas dans le temps et sur le territoire. De façon schématique, si les cas possiblement liés à une même source sont regroupés dans le temps et l'espace, il est considéré qu'il s'agit de cas groupés (cf définition ci-dessus), alors que s'il existe une distribution relativement large dans le temps et l'espace, une épidémie pourra alors être déclarée. 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. La très grande majorité des cas de listériose identifiés par la déclaration obligatoire en France sont sporadiques.

6. Toxi-infection alimentaire collective

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

SURVEILLANCE ALIMENTAIRE

Les alertes-produits

Une alerte produit est lancée quand une denrée alimentaire non-conforme aux critères microbiologiques de sécurité du règlement européen 2073/2005 modifié (100 UFC/g ou absence/présence) [38, 56], 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) [38, 56]. Le CNRL effectue chaque semaine un rapport transmis par courrier électronique aux membres de la Cellule *Listeria*, concernant les souches d'alertes-produits. Il regroupe les informations sur ces souches, indique la fréquence des pulsotypes correspondants parmi les souches humaines depuis son premier archivage dans la base de données du CNR/CCOMS, et liste les souches humaines des 3 derniers mois avec les mêmes caractéristiques microbiologiques. L'InVS investigate cette alerte produit si les pulsotypes sont rares ou pour un pulsotype fréquent ou endémique qui est en cours d'investigation et pour lequel aucune source n'est encore identifiée.

Les enquêtes autour d'un cas de forme neuroméningée

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

SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

La surveillance de la résistance de *Lm* aux antibiotiques est effectuée pour 23 antibiotiques (céfotaxime, sulfonamides, kanamycine, clindamycine, rifampicine, tétracycline, erythromycine, chloramphénicol, ciprofloxacine, moxifloxacine, levofloxacine, linézolide jusque 2012, triméthoprime, gentamicine, acide fusidique, vancomycine, streptomycine, pénicilline G, ampicilline, amoxicilline, acide nalidixique, imipénème, fosfomycine), à la recherche de résistances naturelles ou acquises, selon la méthodologie EUCAST de diffusion. Les résultats de la surveillance des souches d'origine humaine isolées de 2011-2015 sont présentés dans le chapitre 3.3.1.5.

DETECTION ET ANALYSE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES

Le caractère nosocomial des infections à *Lm* est difficile à établir, car l'incubation de la listériose peut être longue [57] et la source alimentaire de l'infection est difficile à identifier.

Ce mode de contamination a été décrit :

- soit par des aliments consommés à l'hôpital,
- soit par transmission croisée, notamment par le biais de matériel contaminé par un enfant infecté (thermomètres, couveuses, huile de soins).

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

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

SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE DE LA LISTERIOSE EN EUROPE

L'ECDC a mis en place un système volontaire d'investigations de cas groupés ou d'épidémies européens au moyen de la plateforme d'échanges EPIS (Epidemic Intelligence Information System), ouverte aux pays européens, mais également aux USA, au Canada, à l'Australie, la Nouvelle-Zélande, l'Afrique du Sud, la Turquie, l'Islande, la Norvège, le Liechtenstein et le Japon. Ce système permet un échange de données de typages et d'informations concernant les cas groupés et les épidémies.

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

Le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (EURL) pour *Lm* coordonne un réseau de laboratoires nationaux de référence (LNR) dont les méthodes de détection et d'énumération des *Lm* dans les échantillons de la chaîne alimentaire et de l'environnement agro-alimentaire, et les méthodes de typage moléculaire PFGE ont été harmonisées. Une base de données, sous l'égide de la DG-SANTE de l'Union Européenne et l'European Food Safety Agency (EFSA), est fonctionnelle.

En 2016, les bases de surveillance moléculaire ECDC TESSY MOL et EFSA EURL *Lm* sont en transition de la PFGE à l'analyse génomique avec les outils analytiques en cours de définition.

[SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE INTERNATIONALE DE LA LISTERIOSE](#)

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

Ce mandat a été renouvelé le 01 novembre 2015 pour une période de 4 ans, sur les termes de référence (missions) suivants :

- Assister l'OMS dans l'amélioration des capacités des pays en termes de surveillance intégrée pour la détection, le contrôle et la prévention de la listériose ;
- Renforcer la capacité des laboratoires pour la surveillance de *Listeria monocytogenes* à travers une assistance techniques aux Etats-Membres de l'OMS ;
- Contribuer à l'implémentation des activités de l'Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) pour le contrôle des AMR relatif à *L. monocytogenes*.

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

En 2012, le CCOMS des *Listeria* a constitué un réseau international des Centres et Laboratoires de Référence des *Listeria* (41 pays membres à ce jour) pour contribuer à la surveillance microbiologique internationale des *Listeria* dont fait partie le CNRL. Cette surveillance internationale existe pour le typage moléculaire PFGE, grâce au réseau Pulsenet [21] et est en cours de remplacement par la nouvelle méthode de typage moléculaire basé sur la génomique : le cgMLST (core genome MLST) développé par le CNRL/CCOMS.

ANNEXE C

DECLARATION NORMALE,
NUMERO DE DECLARATION 1474696V0,
RECEPISSE REÇU DE LA CNIL EN DATE DU 19 JANVIER 2011

Récépissé de déclaration normale

Numéro de déclaration
1474696 v 0

Monsieur LECUIT Marc
INSTITUT PASTEUR
25-28 RUE DU DOCTEUR ROUX
75015 PARIS

Conformément à la loi du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, modifiée en août 2004,

INSTITUT PASTEUR
25-28 RUE DU DOCTEUR ROUX 75015 PARIS
Tél : 0145688345 Fax : 0145688837
Messagerie : SALMONELLA@PASTEUR.FR

A déclaré à la Commission Nationale de l'informatique et des libertés un traitement de données personnelles dont la finalité principale est :

SUIVI ET TRAITEMENT DES DONNEES RELATIVES AU MATERIEL BIOLOGIQUE (SOUCHES ET PRELEVEMENTS) REÇUS AU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE (CNR) DANS LE CADRE DE SES MISSIONS ET CONFORMEMENT AU CAHIER DES CHARGES, A DES FINS DE CARACTERISATION DES SOUCHES ET/OU DE DIAGNOSTIC, ET DE SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE. DE LA RECEPTION DU MATERIEL BIOLOGIQUE JUSQU'AU RENDU DES RESULTATS, LES DONNEES PERMETTENT UN SUIVI EVENTUEL DU PATIENT, ET LE DECLENCHEMENT D'UNE ALERTE DANS LE BUT DE CONTROLER UN PHENOMENE EPIDEMIQUE.

La délivrance de ce récépissé atteste que vous avez effectué une déclaration de votre traitement à la CNIL et que votre dossier est formellement complet. Vous pouvez mettre en œuvre votre traitement. Cependant, la CNIL peut à tout moment vérifier, par courrier ou par la voie d'un contrôle sur place, que ce traitement respecte l'ensemble des dispositions de la loi du 6 janvier 1978 modifiée en 2004. En tout état de cause, vous êtes tenu de respecter les obligations prévues par la loi et notamment :

- 1) La définition et le respect de la finalité du traitement,
- 2) La pertinence des données traitées,
- 3) La conservation pendant une durée limitée des données,
- 4) La sécurité et la confidentialité des données,
- 5) Le respect des droits des intéressés : leur information sur leur droit d'accès, de rectification et d'opposition.

Pour plus de détails sur les obligations prévues par la loi « informatique et libertés », consultez le site internet de la CNIL : « www.cnil.fr »

Fait à Paris, le 19 janvier 2011

Alex Turk

Par délégation de la commission

Alex Turk