

# RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2023

***Année d'exercice 2022***

**CNR *Listeria***

	<b>Organisme / Structure d'hébergement</b>	<b>Responsable</b>
<b>Laboratoire CNR</b>	Institut Pasteur / Unité de Biologie des Infections	Pr. Marc LECUIT

Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent rapport, faite sans l'autorisation écrite du CNR *Listeria* est illicite. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées tout en mentionnant clairement les références de ce présent rapport (A. Leclercq, A. Moura, C. Charlier-Woerther and M. Lecuit. 2023. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence *Listeria* – Année 2022. Institut Pasteur, Paris, France) dont elles sont issues.

Résumé analytique .....	4
<b>Faits marquants</b> .....	4
Executive summary.....	5
<b>Highlights</b> .....	5
1. Missions et organisation du CNR.....	6
<b>Organigramme</b> .....	6
<b>Mission et Organisation</b> .....	6
<b>Démarche Qualité</b> .....	6
2. Activités d'expertise .....	7
2.1 Evolution des techniques .....	7
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees .....	7
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	7
2.4 Collections de matériel biologique .....	7
2.5 Activités d'expertises .....	8
2.6 Activités de séquençage .....	10
2.7 Partage de séquences produites par les CNR.....	12
3. Activités de surveillance.....	13
3.1 Description du réseau de partenaires.....	13
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections .....	13
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux .....	27
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux .....	28
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance .....	33
4. Alertes .....	34
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil .....	41
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	41
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires.....	42
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ... ).....	43
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR.....	44
6.1 Activités de recherche.....	44
6.2 Liste des publications et communications .....	50

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux .....	53
8. Programme d'activité pour les années suivantes.....	54
9. Référence .....	54
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR .....	58
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	58
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	59
1.3 Locaux et équipements.....	60
1.4 Collections de matériel biologique .....	60
1.5 Démarche qualité du laboratoire .....	64
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	66
2.1 Liste des techniques de référence .....	66
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR.....	67
3. Annexe 3 : Déclaration publique d'intérêts du responsable (Marc LECUIT).....	70

## Résumé analytique

### Faits marquants

En 2022, le Centre National de Référence *Listeria* (CNRL) a reçu et analysé 2248 isolats de *Listeria* [2021 : 2210] dans le cadre de ses missions de surveillance dont 468 isolats [2021 : 464] issus de 436 cas humains [2021 : 426], 649 [2021 : 1020] isolats d'alertes produits, 226 [2021 : 252] isolats d'autocontrôles et 905 [2021 : 474] isolats analysés dans le cadre d'investigations de clusters passés et d'étude de la biodiversité.

La méthode de typage moléculaire des isolats est le core génome MultiLocus Sequence Typing (cgMLST), technique de première intention pour la surveillance microbiologique de *Listeria monocytogenes* en France depuis 2017.

En 2022, 61 nouveaux clusters [2021 : 64] ont été détectés par le CNRL et investigués en lien avec SpF et les autres partenaires de la cellule *Listeria*. La source de contamination a été identifiée pour 7 (11%) [2021 : 7%].

Le CNRL a participé en 2022 aux réponses à 21 alertes européennes à la plateforme EPIPULSE de l'ECDC (2021 : 23). Une alerte européenne concernait une épidémie française liée à des substituts de fromage vegan.

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

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

***Le Centre National de Référence Listeria remercie l'ensemble de ses correspondants pour l'envoi des souches et de leurs informations associées, dans le cadre de la surveillance microbiologique de la listériose en France en 2022.***

## Executive summary

### Highlights

In 2019-2020, the National Reference Center *Listeria* (NRCL) received and analyzed 2248 isolates of *Listeria* [2021: 2210] as part of its surveillance missions, including 468 [2021: 464] isolates from 436 [2021: 4261] human cases, 649 [2021:1020] from food alerts, 226 [2021: 252] from own-checks and 905 [2021: 474] isolates analyzed as part of past cluster investigations and biodiversity studies.

The method for molecular typing of isolates is core genome MultiLocus Sequence Typing (cgMLST), which has become the first-line technique for microbiological surveillance of *Listeria monocytogenes* in France since 2017.

In 2022, 61 new clusters [2021:64] were detected by the NRCL and investigated in collaboration with SpF and the other partners of the *Listeria* surveillance structure. The source of contamination was identified in 7 (11%) [2021: 7%].

The NRCL participated in the response to 21 European alerts through the ECDC's EPIPULSE surveillance portal for infectious diseases (EPIPULSE) platform in 2022 (2021: 23). A European alert was issued for a French epidemic linked to vegan cheese substitutes proposed as an alternative to cheese for pregnant women.

As part of its research activities, the NRCL has published studies on the biodiversity, virulence and resistance of *Listeria monocytogenes*, to understand their pathogenic potential and association with food types. The NRCL has also published studies on maternal-neonatal listeriosis and a rare form of listeriosis.

The NRCL has also responded to several national and international requests for expertise related to microbiological surveillance and research on *Listeria*.

# 1. Missions et organisation du CNR

L'ensemble des missions et de l'organisation du CNR sont décrites dans l'Annexe 1 de ce rapport. L'organigramme du CNRL est présenté en Figure 1.

## Organigramme

Figure 1. Organigramme du CNR *Listeria* en 2022

<p><b>Responsable</b> <b>Pr. Marc LECUIT</b> Chef d'Unité, Institut Pasteur, Inserm PU-PH, Université Paris-Cité Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades</p>	<p>Dr. Alexandra MOURA (Microbiologiste, bioinformaticienne) Pr. Caroline CHARLIER (PU-PH, médecin chercheur) Pierre THOUVENOT (Technicien supérieur, responsable HSQE) Hélène BRACQ-DIEYE (Technicienne supérieure, responsable adjoint qualité) Guillaume VALES (Technicien supérieur, responsable informatique) Nathalie TESSAUD-RITA (Technicienne supérieure, responsable réactifs) Andrée DIAKITE (Assistante)</p>
<p><b>Responsable-adjoint</b> <b>Alexandre LECLERCQ</b> (Responsable Métrologie–Qualité)</p>	<p>Stagiaires</p>

## Mission et Organisation

Aucune évolution des missions ou de l'organisation au cours de l'année 2022 par rapport au dépôt de candidature 2017-2021. L'Institut Pasteur a financé l'acquisition en 2022 d'un nouveau thermocycleur (BioRad T100) pour les essais de PCR du CNRL.

## Démarche Qualité

Le CNRL fait partie du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS), qui est accrédité selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189 sous la section Humaine du COFRAC au numéro 8-2588 (disponible sur [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)). Le CNRL possède un correspondant qualité qui anime cette démarche qualité. Des documents transversaux (manuel qualité et organigramme, etc.) ainsi que des procédures générales sont utilisés au sein du LREMS et donc par le CNRL pour assurer un fonctionnement commun dans le cadre de cette démarche qualité. Les activités qui en relèvent sont conduites selon la norme NF EN ISO 15189.

## 2. Activités d'expertise

---

### ELEMENTS CLES DE 2022

- 99,8% des souches réceptionnées d'origine humaine étaient bien identifiées comme *L. monocytogenes*
- Délai de récupération des souches humaines : 6 jours
- Délai médian de restitution des premiers résultats aux laboratoires : 2 jours
- 2.248 souches de *Listeria* séquencées en 2022 dans le cadre de la surveillance microbiologique nationale des *Listeria*

Les techniques disponibles au CNRL sont décrites dans l'Annexe 2.

### 2.1 Evolution des techniques

#### *Validation de nouveaux outils de diagnostic*

Le CNRL a mis en place en 2022 le séquençage des *Listeria* avec la technologie MinION (Oxford Nanopore Technologies) afin de réduire le temps de réponse à une demande urgente des autorités et être autonome sur son activité de séquençage. La faible précision du séquençage MinION ne permet pas encore le typage cgMLST. La performance de la nouvelle génération de flow cell MinION (R10.4.1) est en cours d'évaluation.

### 2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

#### *PCR syndromiques*

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

Le kit le plus utilisé est la PCR syndromique FILM ARRAY (bioMérieux, Marcy l'Etoile) pour les échantillons de sang et de LCR (1-5). Son évaluation est en cours.

### 2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNRL utilise la méthode de typage cgMLST et la transfère aux laboratoires demandeurs. Le CNRL effectue également la gestion et curation de la base de données internationale des génomes BIGSdb-*Listeria* (Alexandra Moura), et assiste biologistes médicaux et chercheurs dans l'analyse de leurs données.

### 2.4 Collections de matériel biologique

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

- celle des souches de référence des espèces *Listeria* qui a été complétée en 2022 avec les souches types des espèces *L. swaminathanii* et *L. goensis* et deux nouvelles espèces américaines (en cours de publication) ;

- celle des souches de l'activité de CNR *Listeria* qui a été complétée en 2022 de 2.248 souches aux 64.781 souches de la collection du CNR *Listeria*.

L'organisation, l'inventaire, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections sont décrits dans l'Annexe 1.

## 2.5 Activités d'expertises

### De la réception des souches au rendu de l'expertise microbiologique

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

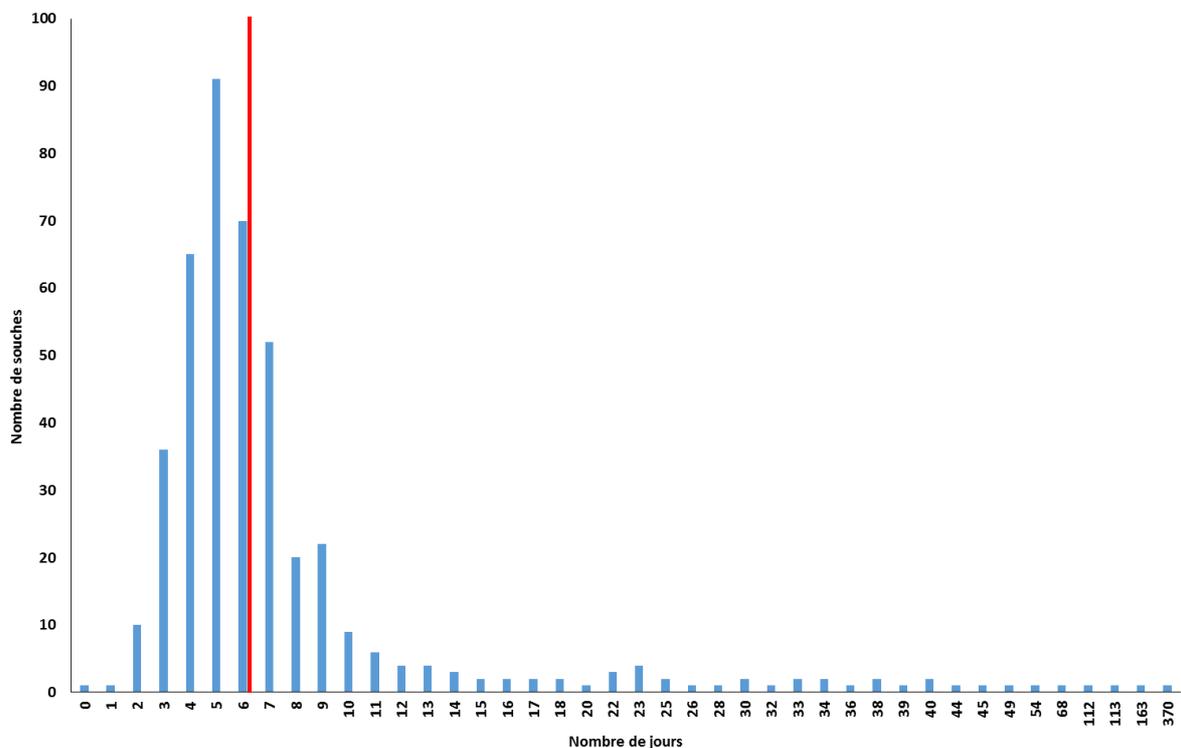
Le CNRL a reçu également en 2022, 606 (2021 : 474) souches isolées de patients ou d'aliments adressées par des laboratoires étrangers (Danemark, Espagne, Corée du Sud) ou de produits importés pour expertise dans le cadre de ses activités de Centre Collaborateur OMS. Le CNRL a également reçu 27 (2021 : 261) souches d'origine environnementale et/ou alimentaire adressées par des laboratoires d'hygiène et de contrôle des aliments pour identification et caractérisation (autocontrôles, prestations payantes). Ces isolats sont intégrés à la surveillance nationale en respectant la confidentialité des données, et peuvent être mises à la disposition des instances qui en feraient la demande, après accord des autorités concernés.

**Tableau 1.** Souches réceptionnées au CNRL en 2022 et analyses effectuées

Nombre de souches		Origine	Pourcentage de fiches de données réceptionnées	Provenance	Identification	PCR séro-groupe	Antibio-gramme	Séquençage et cgMLST
2022	2021							
392	401	Humaines	100%	Centres Hospitaliers	100%	100%	100%	100%
76	63	Humaines	100%	Laboratoires Privés	100%	100%	100%	100%
649	1020	Alimentaires et environnementales (Alertes)	100%	Laboratoires de Microbiologie alimentaire	100%	100%	0%	100%
226	252	Alimentaires et Environnementales (Autocontrôles, intégrés à la surveillance nationale)	100%	Laboratoires de Microbiologie alimentaire	100%	100%	0%	100%
905	474	Humaines, Alimentaires et Environnementale (Investigation historique de clusters)	100%	CNRL	100%	100%	0%	100%
<b>TOTAL : 2248</b>	2210	-	100%	-	100%	100%	100% des souches humaines	100%

### Délai identification / réception

Le délai médian entre le prélèvement et la réception des souches au CNRL est de 6 jours (2021 : 6 jours) (Figure 2). Les délais extrêmes s'expliquent par le temps écoulé entre la déclaration obligatoire et la réception de la souche, malgré les relances de SpF.



**Figure 2.** Distribution des délais entre le prélèvement et la réception au CNRL pour les souches d'origine humaine réceptionnées en 2022 (médiane en rouge).

### Non-conformité de souches

Au CNRL, la spectrométrie de masse remplace depuis aout 2016 la méthode API-*Listeria* (bioMérieux) comme méthode de détermination du genre et de l'espèce (6, 7). La détermination de l'espèce *L. monocytogenes* par les laboratoires d'analyse médicale (LABM) repose de façon croissante également sur la méthode de spectrométrie de masse Maldi-Tof. Le CNRL utilise une extraction totale des protéines pour la préparation de son dépôt alors que les biologistes utilisent souvent un dépôt direct, plus rapide et moins onéreux, mais qui peut parfois aboutir à des résultats douteux. Les biologistes rapportent les ambiguïtés d'identification au CNRL et envoient les souches pour confirmation.

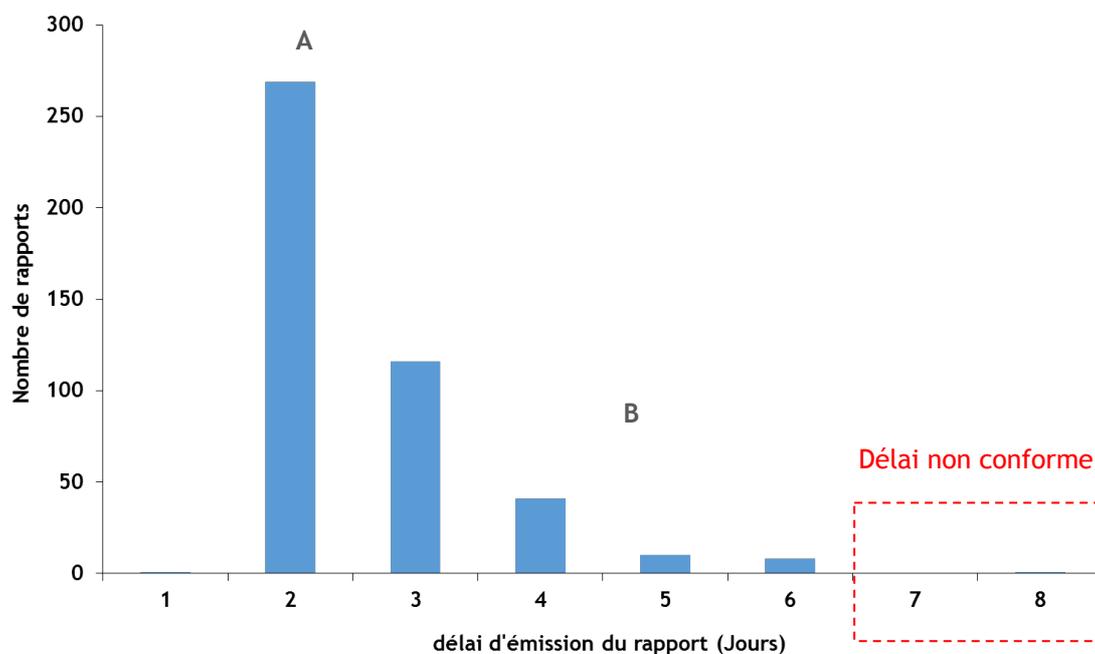
Parmi les souches qui nous ont été adressées en 2022, la détermination de l'espèce quelle que soit leur origine était correcte dans 99,8% des cas (vérifiée par séquençage ; identification erronée : *Enterococcus faecalis*). 99,8% des souches humaines furent bien identifiées comme *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* subsp. *Ivanovii* (1 souche).

### Envoi du rapport d'essai

Le délai médian entre réception de la souche au CNRL et envoi du rapport d'essai (incluant l'identification de l'espèce et le sérotype PCR) a été de 2 jours en 2022 (3j en 2021) (Figure 3), inférieur au délai cible de 4 jours défini par le système qualité du CNRL.

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

Le délai peut s'allonger si (i) les souches sont adressées après le mercredi ou lorsque des jours fériés décalent la date d'obtention des résultats à la semaine suivante (+3 jours) et (ii) en cas de nécessité de purification de la souche, de tests phénotypiques complémentaires ou de souches nécessitant plusieurs essais de mises en culture. Les délais non-conformes (0,2% des souches humaines en 2022) étaient tous liés à des difficultés techniques, des jours non ouvrés ou à l'identification de bactéries non-*Listeria*.



**Figure 3.** Distribution des délais entre la réception de la souche au CNRL et l’envoi du rapport d’essai pour les souches d’origine humaine réceptionnées en 2022 (A, rapports d’analyses sans week-end ; B, rapports d’analyses avec week-end et jours fériés)

L’ensemble de ces résultats illustre la qualité du réseau de microbiologistes qui interagissent 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.

## 2.6 Activités de séquençage

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Plateforme de microbiologie mutualisée (P2M) de l’Institut Pasteur, externe au CNRL.
	Sequencur NextSeq 500 (Illumina).

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?

NON

\* OUI  
Interne au CNRL (Dr. Alexandra Moura, bioinformaticienne)  
Outils utilisés : Assemblages génomes avec des outils open source (fqCleaner, SPAdes and Pilon), typage et caractérisation *in silico* avec la plateforme BIGSdb-*Listeria* (open source, hébergé par le CNRL), visualisation des clusters avec Bionumerics (commercial), GrapeTree (open source) et iTol (open source).

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?

NON

\* OUI  
Le CNR utilise depuis 2015 la technique de séquençage génomique.

Cette méthode a été évaluée par le CNRL et mise en place comme technique de référence en 2017 (Moura *et al.*, *Emerg Infect Dis* 2017).

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

Le CNRL utilise les données de séquençage pour déterminer le sérotype PCR (déterminé aussi par PCR pour une réponse plus rapide et comme contrôle interne), le type MLST, le type cgMLST, et le virulome, résistome de ces souches, avec la plateforme BIGSdb-*Listeria* (<https://bigsdbs.pasteur.fr/listeria/>). Les analyses de cgMLST peuvent être complétées par des analyses wgSNPs (analyse de la totalité du génome), si nécessaires.

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

En 2022, le CNRL a séquençé 2306 souches de *Listeria* (2021 : 2238) dont certaines dans le cadre d'études des investigations, clusters et épidémies (n=652 en 2022 et n=483 en 2021) au niveau national, européen et au-delà. La différence avec le nombre de souches réceptionnées au CNRL vient des abandons d'analyses lors d'alertes produits ou de réception de souches finalement attribuées à d'autres espèces.

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

En 2022, le CNRL a séquençé 1554 souches de *Listeria* (2021 : 1755) dans le cadre de son activité de surveillance

Toutes les souches *Listeria* reçues sont séquençées et incorporées à la surveillance nationale.

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences : génomes assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Tous les génomes du CNRL sont déposés dans BIGSdb-*Listeria* (<https://bigsdbs.pasteur.fr/listeria/>).

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : Tous les profils cgMLST sont publics (sans génome ni métadonnées associées) dans BIGSdb-*Listeria*. Pour certains génomes (épidémies, souches avec gènes des résistances antibiotiques, études de biodiversité, etc.), les données brutes (fastq files) sont aussi déposées dans ENA sans métadonnées associées.

## 2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Tous souches reçues au CNRL isolées de patients ou d'aliments, et adressées par des laboratoires français ou étrangers sont séquencées et leur génome déposé dans BIGSdb-*Listeria* (<https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/>). Tous les profils cgMLST sont partagés et accessibles au public au niveau national et international dans BIGSdb-*Listeria*. Les assemblages et métadatas restent privés pour respecter la confidentialité des données.

Pour certains génomes (épidémies, souches avec gènes des résistances antibiotiques, études de biodiversité, etc.), les données brutes (fastq files) sont aussi déposées dans ENA.

## 3. Activités de surveillance

---

### ELEMENTS CLES DE 2022

- Taux d'exhaustivité de réception des souches humaines de 97% (2021 : 98%) et des souches d'alertes produits de 61% (2021 : 75%)
- 436 cas de listériose (2021 : 426), avec prédominance des bactériémies, en augmentation depuis 2020
- Âge médian stable des cas à 76 ans (2021 : 74 ans)
- Un cas de septicémie à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*
- Principale cause des rappels de produits alimentaires (source site web RappelConso, DGCCRF)
- 9% de nouveaux clusters avec la source de contamination identifiée (2021 : 7%)
- La structure de la population des souches de *Listeria monocytogenes* est restée stable en comparaison avec 2021-2022

### 3.1 Description du réseau de partenaires

En 2022, les laboratoires expéditeurs des souches cliniques (n=436) sont hospitaliers à 85% (85% en 2021), reflétant la sévérité de la listériose. Les autres structures sont des laboratoires privés 15% (15% en 2021). La listériose étant une maladie à déclaration obligatoire, le réseau du CNRL couvre le territoire français incluant métropole et DROM-TOM-COM.

### 3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

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

- Un cas de **listériose materno-néonatale** est un cas où *L. monocytogenes* 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 ( $\leq 28$  jours). La mère et son enfant comptent pour un cas.
- Un cas de **listériose non materno-néonatale** est un cas où une souche de *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* dans une hémoculture, en l'absence d'argument pour une atteinte neurologique;
  - d'une **forme neurologique (N)** définie par la présence de *L. monocytogenes* dans la culture d'un liquide céphalo-rachidien (LCR), dans le contenu d'un abcès cérébral, ou dans une hémoculture chez un patient avec atteinte neurologique clinique ou neuroradiologique (sans diagnostic alternatif);
  - d'une **autre forme (A)** définie par la présence de *L. monocytogenes* dans un prélèvement non-fécal et non-sanguin, materno-fœtal ou cérébro-spinal.

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

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

### 3.2.1. Analyse globale des cas de listériose

#### Nombre total de cas

**En 2022, le CNRL a reçu 474 souches humaines (461 en 2021) liées à 451 cas (435 en 2021) d'infections humaines déclarées à SpF en France métropolitaine.** La différence observée entre nombres de souches et de cas est liée à l'existence de souches envoyées à l'année n+1, de doublons voire triplicatas de souches (n=37 ; 2021 : n=35) par patient, des souches non conformes [n=1 ; tube cassé (2021: 0)] non prises en compte dans l'analyse finale.

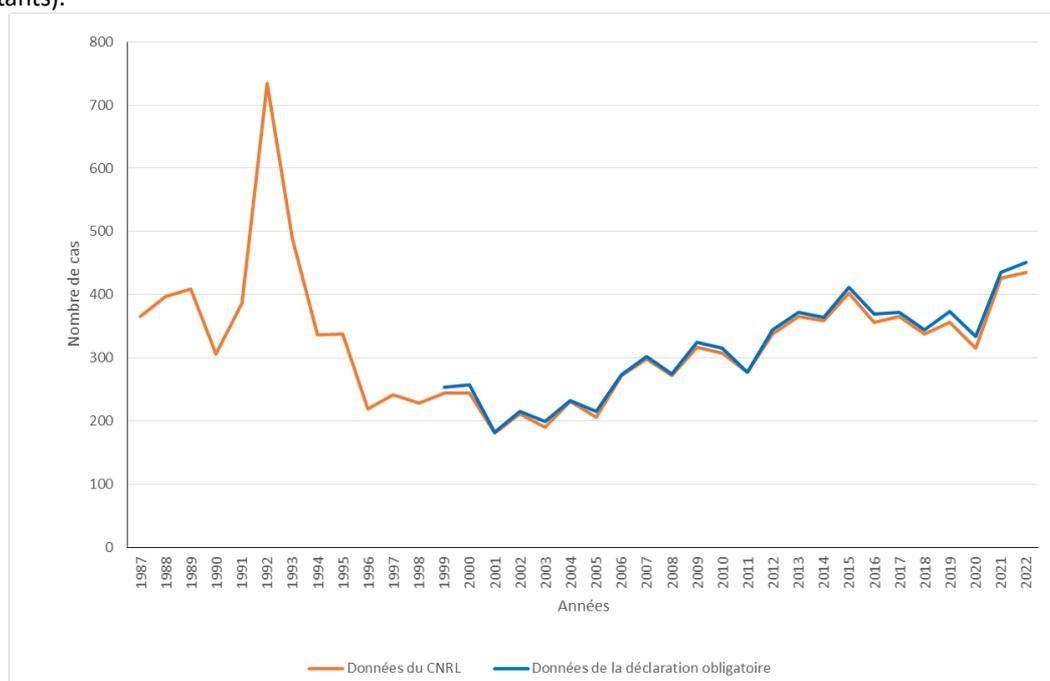
En 2022, un cas était un second épisode de listériose 2 mois après un premier épisode. Ces deux épisodes étaient causés par la même souche (génosergroupe IVb; type cgMLST: L1-ST388-SL386-CT11671), reflétant possiblement un traitement insuffisant du premier épisode.

Pour 2022, le CNRL retient donc, après recoupement des données de SpF, 436 cas de listériose à *Lm* avec souches isolées (426 en 2021) au jour du traitement statistique de ce rapport, et un cas de listériose à *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* (SpF retient 15 cas supplémentaires en 2022 (2021 : 9) diagnostiqués par PCR ou sans souche associée à la DO): 430 en France métropolitaine (2021 : 415) et 6 dans les DROM-COM-TOM (2021 : 11).

Depuis 1992, l'incidence de la listériose en France a suivi l'évolution suivante :

- Diminution importante dans les années 1990 de 700 à environ 200 cas par an.
- Augmentation modérée depuis 2006 entre 300 et 400 cas / an (Figure 4) (8).

L'incidence de la listériose humaine est de 6,6 cas par million d'habitants en 2022 (2021 : 6,3 cas par million d'habitants).



**Figure 4.** Nombre de cas recensés en France par le CNRL et par la Déclaration Obligatoire (Source : SpF) entre 1987 et 2022

### Taux d'exhaustivité

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

Le taux d'exhaustivité de réception des souches par rapport à l'ensemble des cas recensés est de 97% en 2022 (2021 : 98%) du fait de l'augmentation des cas diagnostiqués par PCR (Figure 4).

NB : Les données de Santé Publique France obtenues par technique de capture / recapture sur les systèmes de surveillance de la listériose et Epibac (surveillance des infections invasives) de 2008 à 2013 a permis d'évaluer l'exhaustivité de la déclaration obligatoire de la listériose en France entre 85 et 87% (9).

### Cas de listériose dans les DROM-TOM-COM

En 2022, 6 cas sporadiques de listériose (2021 : 11 cas) ont été identifiés dans les DROM-TOM-COM :

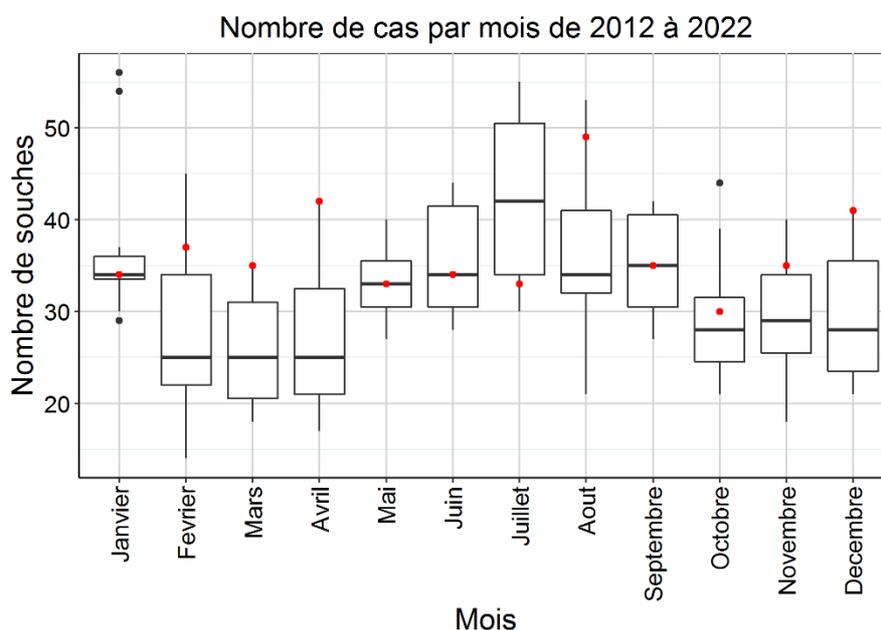
- 2 cas (2021 : 6) dans l'île de la Réunion, DROM le plus peuplé,
- 2 cas (2021 : 1) cas en Guyane française,
- 1 cas (2021 : 1) en Martinique,
- 1 cas (2021 : 2 ) cas en Polynésie française – Tahiti (non comptabilisé par SpF).

Des souches ont été incluses dans 3 clusters FR\_1 (1 souche), FR\_439 (1 souche), FR\_438 (2 souches) qui ne sont pas spécifiques des DROM-TOM-COM.

### Distribution temporelle des cas métropolitains

Le nombre mensuel de cas observés en 2022 est présenté dans la Figure 5.

Entre 2017 et 2022, les mois où le plus grand nombre des cas ont été notifiés sont juin, juillet, septembre et janvier (Figure 5). Les raisons de cette saisonnalité ne sont pas connues.



**Figure 5.** Distribution mensuelle des cas de listériose en France métropolitaine entre 2012 et 2022 (Le point rouge indique le nombre de cas pour 2022)

### Distribution géographique

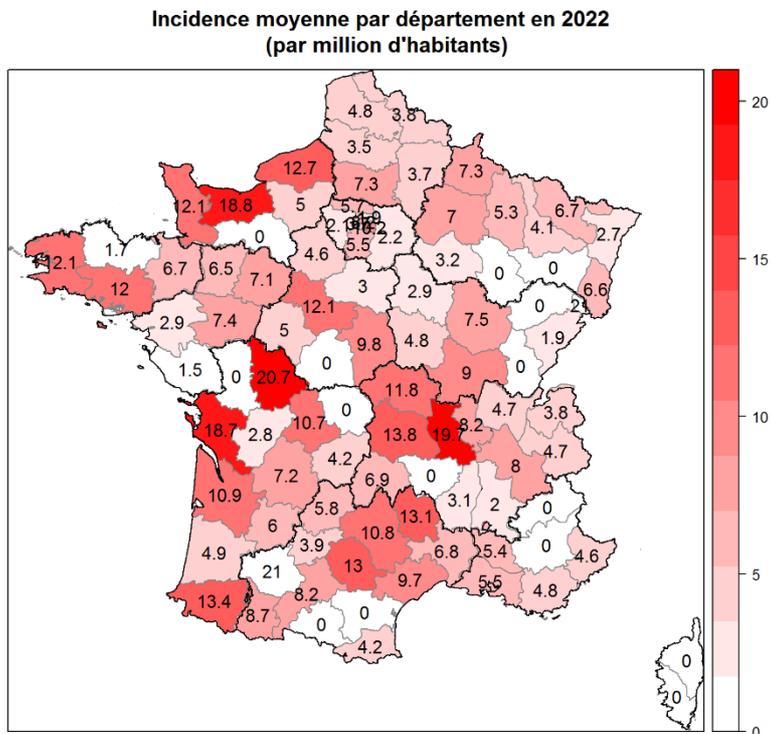
La distribution géographique des cas par département est présentée dans la Figure 6.

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

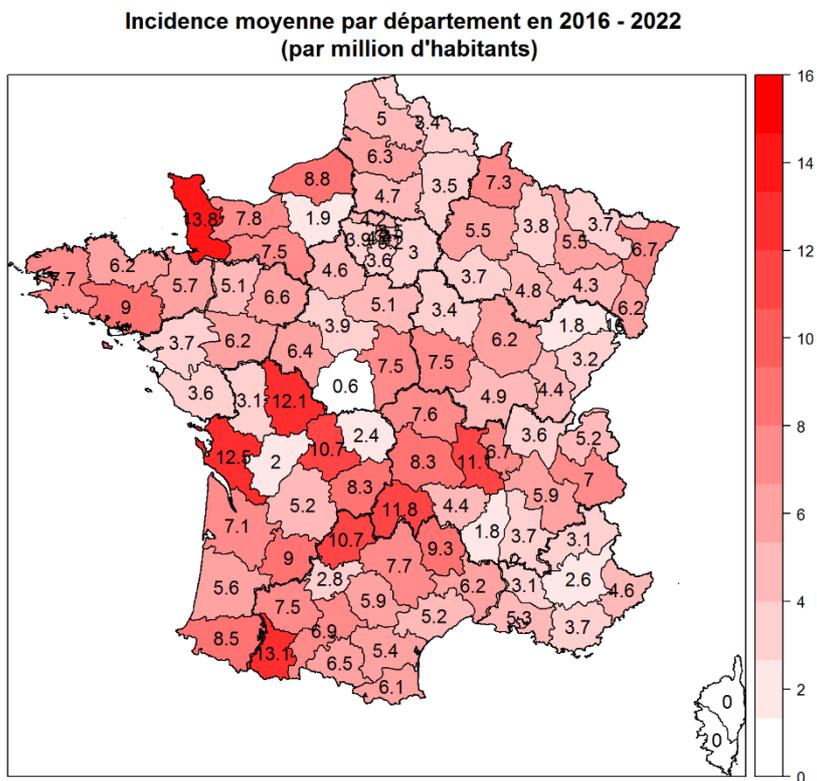
En 2022, l'incidence de la listériose était la plus élevée dans la Vienne, le Calvados, la Loire, et la Charente-Maritime (Figure 6A). On note entre 2017 et 2022 une incidence de listériose légèrement plus élevée dans la moitié ouest de la France (Figure 6B).

**Figure 6.** Incidences départementales des cas de listériose en 2022 (A) et de 2016 à 2022 (B) (Incidence par million d'habitants par département). En surligné noir, le découpage des régions.

**A**



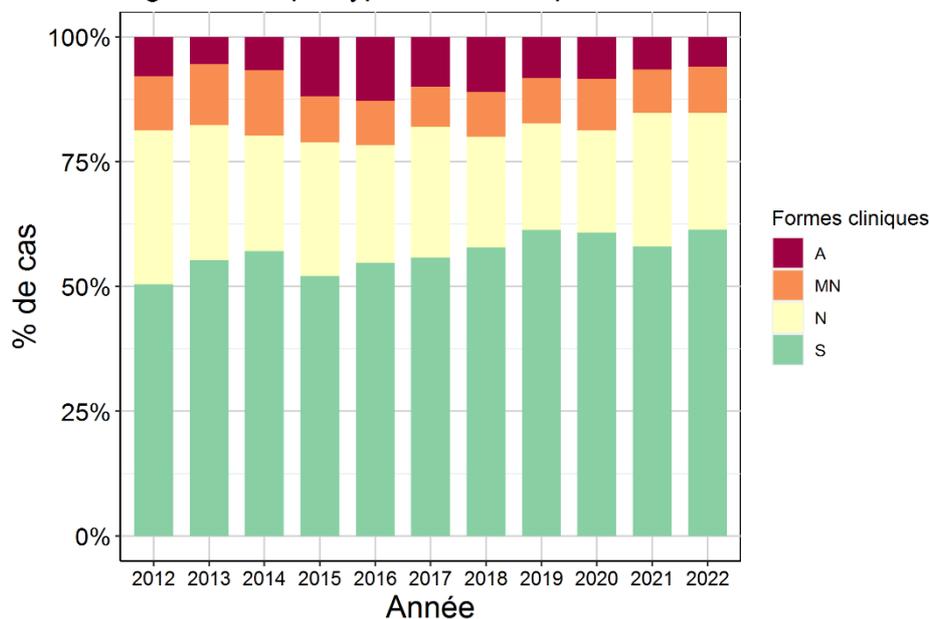
**B**



## Analyse par forme clinique

La distribution des types d'infection qui était stable depuis 2012, avec une prédominance des formes septicémiques (61% en 2022 contre 58% en 2021) qui augmentent depuis 2020, puis neurologiques, et enfin materno-néonatales et autres formes invasives (Figure 7). Les causes de cette augmentation des formes septicémiques sont en cours d'investigation.

Pourcentage de chaque type d'infection par année de 2012 à 2022



**Figure 7.** Distribution des cas de listériose survenus en France métropolitaine depuis 2012 par forme clinique et par année. Formes cliniques : S, Septicémique ; N, Neurologique; MN, Materno-Néonatale ; A, Autres formes.

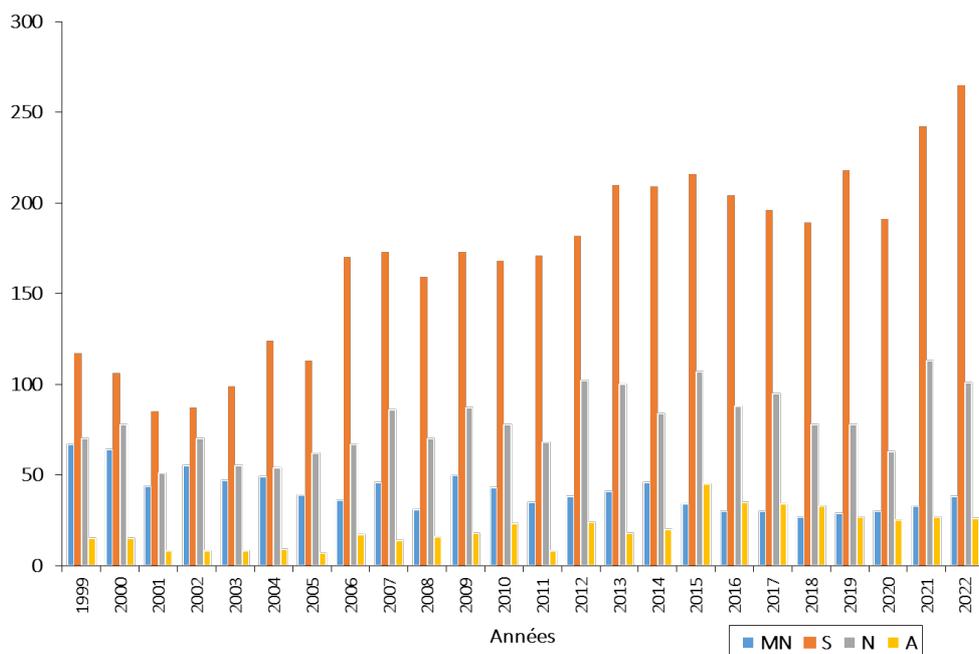
### Formes materno-néonatales

Entre 2022, 38 formes materno-néonatales (MN) ont été enregistrées (2021 : 33), représentant 8 % du nombre total de cas (2021 : 8%).

En 2022, l'incidence des formes MN était de 5,3 cas pour 100.000 naissances vivantes (2021 : 5,25).

### Formes non materno-néonatales

Entre 2022, 392 formes non materno-néonatales ont été enregistrées (2021 : 382), soit 92% (2021 : 92%) du total des cas sporadiques comme depuis 2016. Elles se répartissent en 265 (2021 : 242) formes septicémiques, 101 (2021 : 113) neurologiques et 26 (2021 : 27) autres formes. La Figure 8 indique leur répartition.



**Figure 8.** Évolution de la répartition des formes cliniques par année, depuis 1999. Formes cliniques : S, Septicémique ; N, Neurologique; MN, Materno-Néonatale ; A, Autres formes.

Le Tableau 2 décrit la répartition des infections invasives classées comme « autres formes » de 2012 à 2022.

Les infections ostéo-articulaires, biliaires, urinaires, oculaires, pleuro-pulmonaires, endovasculaires, cutanées et ganglionnaires ont fait l'objet d'analyses spécifiques dont les résultats ont été publiés (11-18). Une étude concernant les infections de liquide d'ascite est en cours.

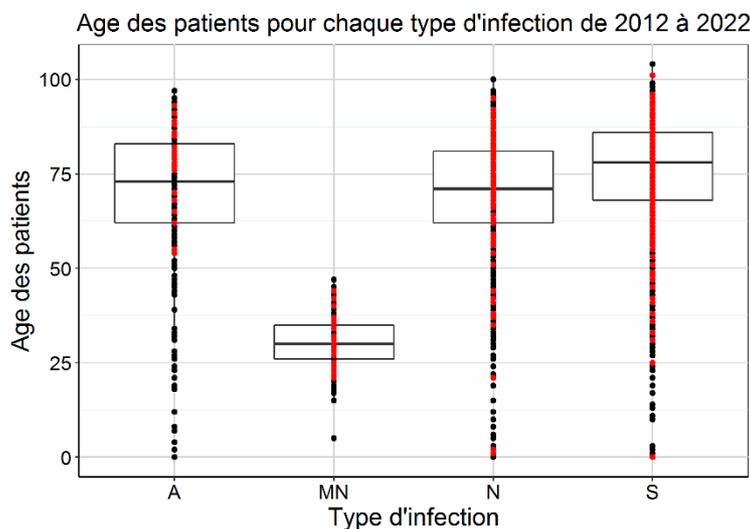
**Tableau 2.** Répartition des autres formes de listériose de 2012 à 2022

Autres formes	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	Total
Vasculaire	1	1	1	2	3	4	1	4	1	0	2	20
Ganglionnaire	1	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	5
Endocardite	0	1	2	2	3	0	3	0	0	0	0	11
Osseuse/articulaire	5	6	8	18	12	4	9	7	6	6	3	84
Digestive	3	1	1	3	1	0	4	0	2	2	1	18
Hépatique	0	0	0	2	1	1	1	1	1	1	0	8
Œdème	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Érysipèle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infection d'ascite	12	7	4	9	8	15	6	7	10	6	9	93
Infection urinaire	2	0	0	0	1	0	1	0	2	5	1	12
Pneumopathie	3	1	3	3	3	2	2	1	1	1	5	25
Prostatite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infection oculaire	0	0	0	3	0	1	1	1	2	0	1	9
Infection cutanée	0	0	0	3	2	2	2	0	0	0	0	9
Abcès	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	3
Autre	0	0	0	0	1	1	2	5	0	3	4	16
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>45</b>	<b>36</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>26</b>	<b>25</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>314</b>

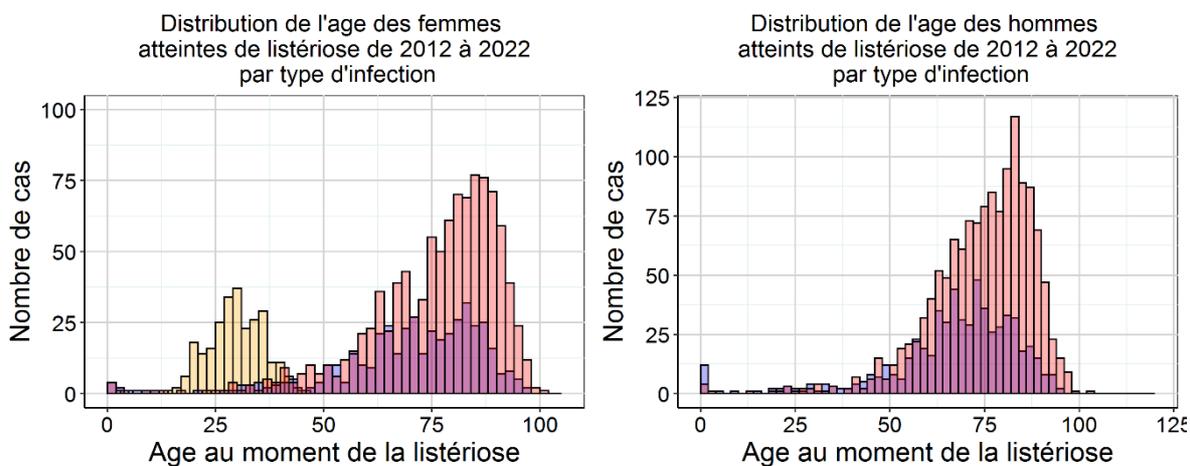
## Âge et répartition par sexe des patients avec listériose non materno-néonatale :

L'âge moyen des patients avec forme non-MN est de 71 ans en 2022 (2021: 69,6 ans), avec une médiane de 76 ans (0 à 101 ans; 74 ans en 2021 et 62 ans en 1999) (Figure 9).

La distribution par classe d'âge des cas non materno-néonataux est présenté en Figure 10.

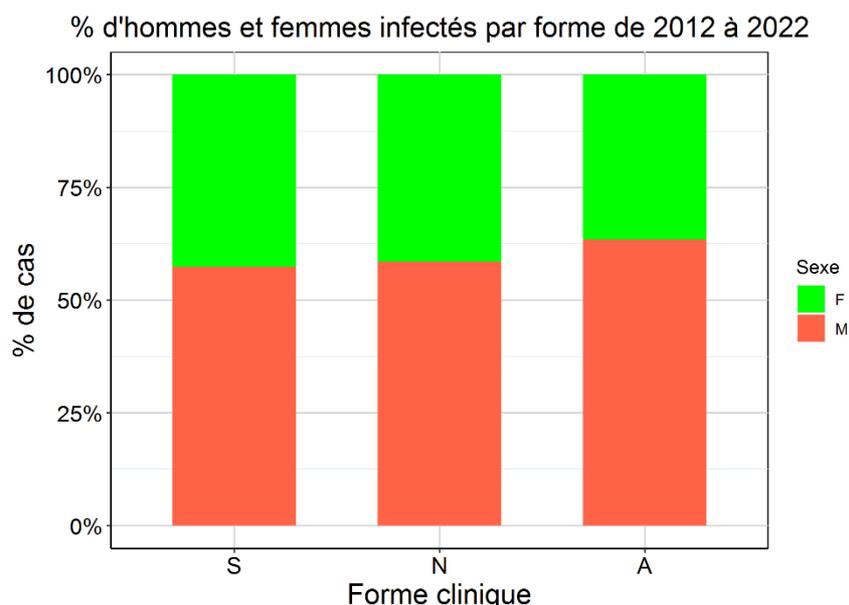


**Figure 9.** Données cliniques associées aux souches réceptionnées de 2012 à 2022 (formes cliniques et l'âge du patient). En rouge, les cas de 2022.



**Figure 10.** Distribution de l'âge des patients atteints de listériose entre 2012 et 2022 selon le sexe et le type d'infection. En jaune, les formes materno-néonatales. En rouge, les septicémies. En bleu, les formes neuro-méningées. La superposition des formes septicémiques et des formes neuro-méningées apparaît en violet.

La distribution par sexe montre un excès d'hommes par rapport au sex-ratio attendu dans cette classe d'âge (Figure 11). Le sex-ratio M/F était de 1,4 comme entre 2017 et 2021 (2021 : 1,6). Cette prédominance masculine des formes non-MN est constatée dans d'autres pays occidentaux (19, 20) (différences d'exposition alimentaire ? Prédilection génétique liée au sexe ? Différences de réponses immunitaires liées au sexe ? Nombre de comorbidités immunosuppressives ?).



**Figure 11.** Répartition selon le sexe des formes cliniques (Formes cliniques : S, Septicémique ; N, Neurologique; MN, Materno-Néonatale ; A, Autres formes) de 2012 à 2022

### 3.2.2. Analyse microbiologique

#### Analyse par séro groupe PCR

#### Analyse générale

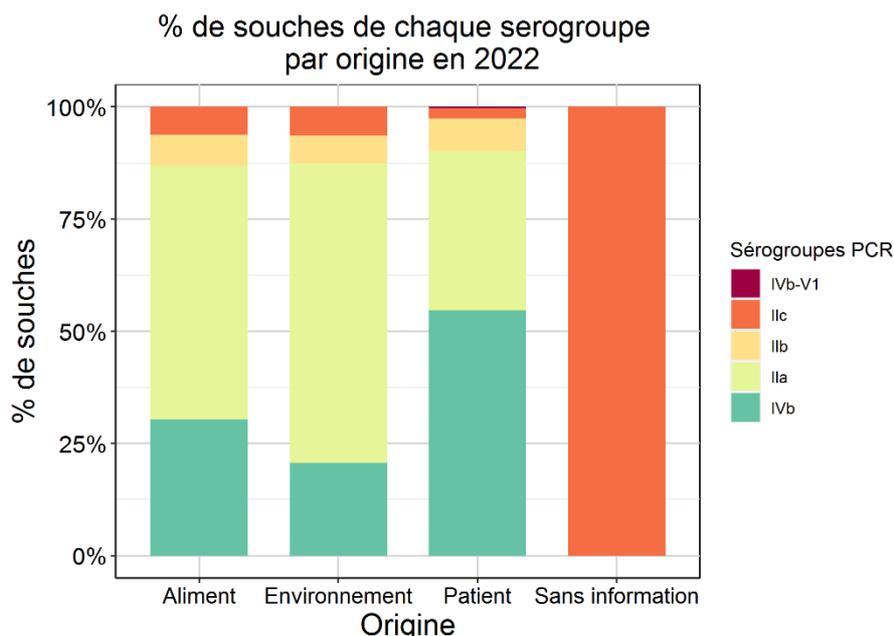
Les distributions par séro groupe PCR et par année des souches d'origine humaine isolées de 2012 à 2022 en France métropolitaine sont présentées dans le Tableau 3 et la Figure 12.

Le séro groupe PCR majoritaire des souches humaines était le séro groupe PCR IVb comme depuis 2017. En 2022, il représente 55% des souches, suivi du séro groupe PCR IIa (35%), IIb (8%), IIc (2%) et L (0%). Depuis 2006, cette distribution est stable, et diffère de celle des souches alimentaires, pour lesquelles le séro groupe PCR IIa est majoritaire (59% entre 2017-2022 contre 2022 : 58%) (Figure 12).

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

**Tableau 3.** Répartition des groupes PCR par année depuis 2012

Sérogroupe PCR	Souches du sérovar	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
IIa	1/2a ou 3a	98 (29%)	135 (37%)	137 (38%)	129 (32%)	126 (35%)	138 (39%)	104 (32%)	119 (34%)	96 (31%)	148 (36%)	151 (35%)
IIb	1/2b, 3b ou 7	43 (13%)	32 (9%)	39 (11%)	65 (16%)	45 (13%)	42 (12%)	32 (10%)	28 (8%)	21 (7%)	29 (7%)	32 (8%)
IIc	1/2c ou 3c	12 (3%)	12 (3%)	9 (3%)	10 (3%)	9 (3%)	6 (2%)	12 (4%)	9 (3%)	7 (2%)	14 (3%)	10 (2%)
IVb (+IVb-v1)	4b, 4d ou 4e	185 (55%)	182+2 (51%)	172+2 (48%)	198 (49%)	176+1 (49%)	166+1 (47%)	177 (54%)	195+1 (56%)	185 (60%)	223+1 (54%)	236+1 (55%)
L	4ab ou 4c ou 4a	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (<1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Total</b>		<b>338</b>	<b>363</b>	<b>359</b>	<b>402</b>	<b>357</b>	<b>353</b>	<b>326</b>	<b>352</b>	<b>309</b>	<b>415</b>	<b>430</b>



**Figure 12.** Répartition des sérogroupe PCR par origine

#### Distribution des groupes PCR selon la forme clinique

Les souches des groupes PCR IVb et IIa sont les plus fréquentes parmi les isolats cliniques, quel que soit le type d'infection (Tableau 4 et Figure 12). En 2022, le sérogroupe PCR IVb est impliqué dans 55% des listérioses (2021: 53%), et dans 63% (2021: 64%) des formes MN et 64% (2021: 63%) des formes N (Tableau 5). Le sérogroupe PCR IIc n'est que très rarement responsable de listériose humaine. La grande majorité des souches IIc expriment une internaline (InIA) tronquée (21-23).

**Tableau 4.** Répartition des sérogroupe PCR des souches selon les formes cliniques en 2019-2022

	Materno-néonatale		Septicémie		Infections du système nerveux central		Autres		Total	
	2021	2022	2021	2022	2021	2022	2021	2022	2021	2022
IIa	7	12	100	97	32	29	9	13	148 (36%)	151 (35%)
IIb	3	2	16	24	8	5	2	1	29 (7%)	32 (8%)
IIc	2	0	9	7	2	2	1	1	14 (3%)	10 (2%)
IVb + IVb <sub>v1</sub>	21	24	117	136+1	70+1	65	15	11	223+1 (54%)	236+1 (55%)
L	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0%)	0 (0%)
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>38</b>	<b>242</b>	<b>265</b>	<b>113</b>	<b>101</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>415</b>	<b>430</b>

#### Analyse MLST

Depuis 2015, le CNRL détermine le CT (cgMLST) et CC (MLST) de ces souches par une extraction *in silico* de profils alléliques de la séquence génomique. Ceci permet d'identifier des clusters de cas et aussi permet d'étudier la distribution des CC dans les échantillons cliniques et alimentaires (23).

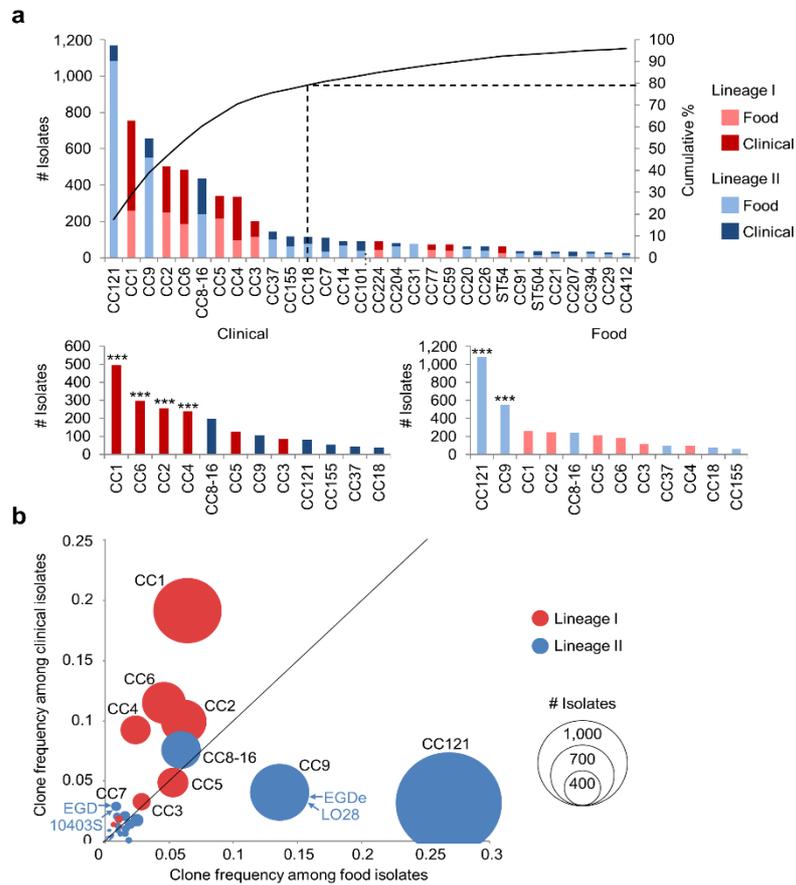
#### Aspect général

La prévalence et la distribution des clones MLST dans les échantillons cliniques et alimentaires ont été étudiées sur 6633 isolats collectés par le CNRL entre 2005 et 2013 (23).

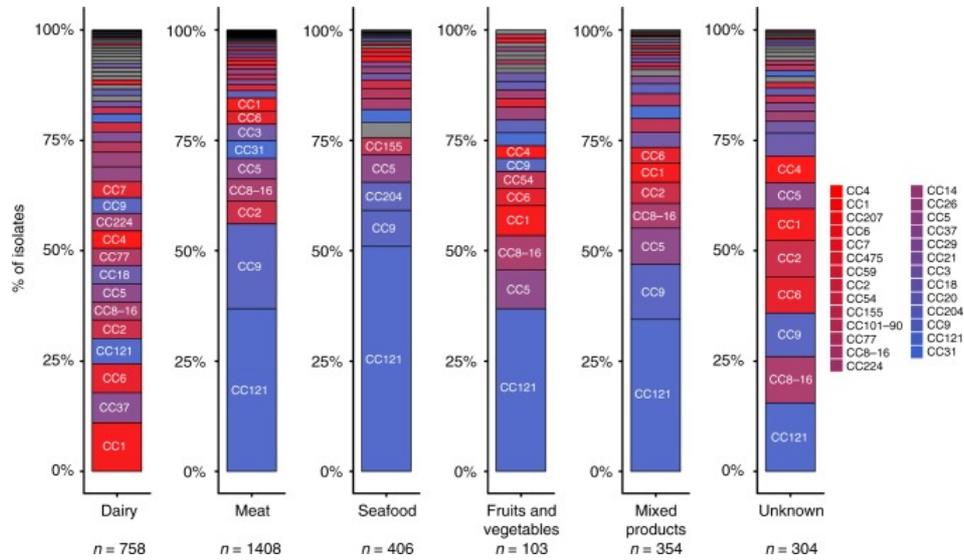
Cette étude a démontré l'existence de 12 clones MLST majeurs chez *Lm*, qui représentent près de 80% des souches cliniques et alimentaires (Figure 13). En France, les clones CC1, CC2, CC4 et CC6 sont significativement associés à une origine clinique, alors que les clones CC9 et CC121 sont significativement associés à une origine alimentaire. 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 (23).

Une étude de la prévalence et la distribution des CC dans les différentes catégories d'aliments (Figure 14) de 3333 isolats alimentaires réceptionnés au CNRL de 2005 à 2016 a montré que les clones hypervirulents de *Lm* (CC1, CC4 et CC6), particulièrement CC1, étaient fortement associés aux produits laitiers alors que les clones hypovirulents CC9 et CC121 aux produits carnés (24).



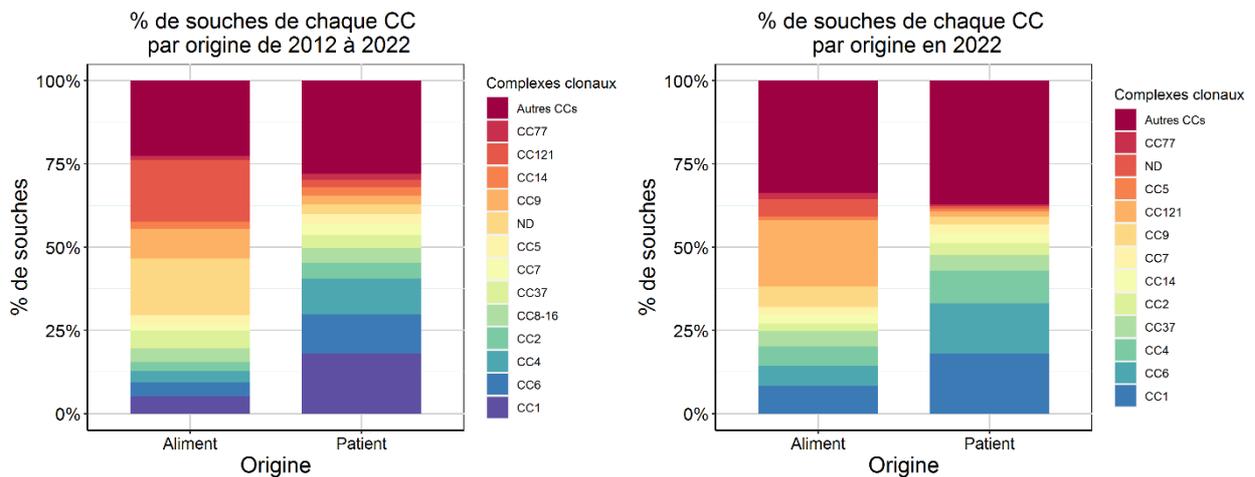
**Figure 13.** Prévalence et distribution des clones MLST de *Lm* dans les sources clinique et alimentaire d'isolement (Source : Maury, Tsai *et al.*, Nature Genetics 2016). Seuls les clones avec plus de 10 isolats sont représentés. (a) Prévalence des clones MLST de *Lm*. La courbe représente le pourcentage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

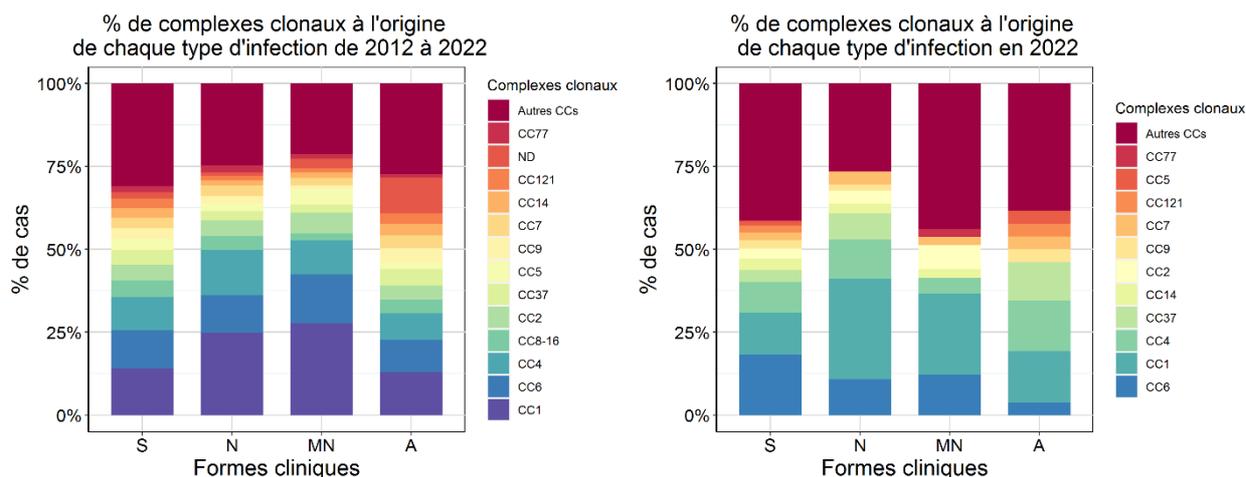


**Figure 14.** Prévalence et distribution des clones MLST de *Lm* dans différentes catégories d'aliments (Source : Maury *et al.*, Nature Communications 2019). Le pourcentage d'isolats de chaque CC par type d'aliment (produits laitiers, produits carnés, fruits de mer, fruits et légumes, produits mixtes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

La Figure 15 montre la distribution, par formes cliniques, des différents clones des isolats cliniques collectés de 2012 à 2022. Elle montre une grande diversité des clones impliqués dans les infections cliniques, avec la prédominance des clones hypervirulents (CC1, 2, 4 et 6) dans les infections neurologiques et materno-néonatales (23).

**A**



**B**

**Figure 15.** Distribution des clones MLST par origines et types d'infection pour les isolats collectés de 2012 à 2022. (A) Distribution par origines. (B) Distribution par types d'infection. Les clones les plus fréquents sont représentés. Formes cliniques : S, Septicémique ; N, Neurologique; MN, Materno-Néonatale ; A, Autres formes.

### Analyse génomique par cgMLST

En 2022, les 430 souches humaines appartiennent à 326 types cgMLST (2021 : 344) dont 218 types cgMLST étaient sporadiques (1 isolat/cgMLST type).

L'analyse des clusters de cas réalisée par le CNRL et SpF se trouve au chapitre 4.2 de ce rapport.

### 3.2.3. Caractérisation des souches d'origine non humaine reçues au CNRL

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

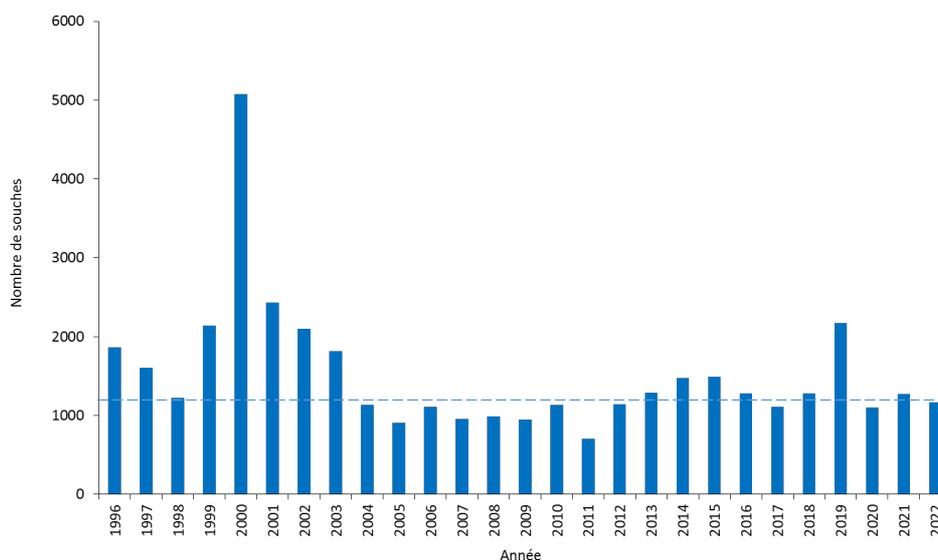
En 2022, une souche d'origine animale (vétérinaire) a été transmise au CNRL dans le contexte d'une kératectomie lamellaire œil droit chez un cheval (cgMLST L2-SL37-ST37-CT12431, géosérotype PCR IIa).

### Analyse générale

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

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

En 2022, 1167 souches (2021 : 1275) de cette catégorie ont été reçues de France métropolitaine (baisse de 8% par rapport à 2021) (Figure 16).



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

#### - Les laboratoires expéditeurs

La répartition des 1167 souches non humaines reçues au CNRL en 2022, par catégories de laboratoires expéditeurs, a montré une diminution du nombre de souches envoyées par les Laboratoires Vétérinaires Départementaux (38% pour 2006-2011 à 13% pour 2022) au profit des laboratoires privés.

La répartition entre les différents laboratoires expéditeurs est la suivante: laboratoires vétérinaires départementaux (13%) [2021: 17%], laboratoires privés d'hygiène alimentaire (84%) [2021: 81%], laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (<1%) [2021: 1%], laboratoires ANSES hors LNRL (3%) [2021: <1%], laboratoires d'Hygiène de Centres Hospitaliers (0%) [2021: <1%] et laboratoires de recherche (0%) [2021: <1%].

#### - L'origine des souches

La répartition par origine des souches non humaines reçues en 2022 est la suivante: alimentaire (72%) [2021: 74%], environnementale (27%) [2021: 26%], recherche/sans information (1%) [2021: <1%], et vétérinaire (<1%) [2021:<1%].

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

#### - Remarques

97% des souches reçues en 2022 appartenaient à l'espèce *L. monocytogenes* (2021 : 97%). Certains laboratoires, à la demande de leurs clients, envoient pour confirmation des souches d'autres espèces de *Listeria* dans le cadre de la surveillance de *Listeria* spp. dans l'environnement des ateliers de production et de leur plan de maîtrise sanitaire (76) et suite à la parution de l'instruction technique DGAL/SDSSA/2019-555.

En 2022, le taux de réception de cultures contaminées par d'autres espèces bactériennes est de 12% (2021 : 11%). Les cultures non pures entraînent un surcout analytique, allongent le délai d'analyse et peuvent entraîner un retard dans les investigations épidémiologiques.

### Souches isolées d'aliments

#### - Catégories de laboratoires ayant adressé les souches

La répartition des 844 souches isolées d'aliments reçues au CNRL en 2022 (2021 : 946) pour les différentes catégories de laboratoires expéditeurs était la suivante: Laboratoires Vétérinaires Départementaux, 12% [2021: 16%] ; laboratoires privés d'hygiène alimentaire, 86% [2021: 82%] laboratoires Interrégionaux de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, <1% [2021: 1%] ; Laboratoires ANSES dont LNRL, 2% [2021: <1%], et laboratoires d'hygiène de Centres Hospitaliers, 0% [2021: <1%].

En 2022, le nombre de souches isolées d'aliments reçues au CNRL a diminué de 11% par rapport à 2021. Parmi elles, 1 souche (réceptionnée par le LNRL) provenait d'un échantillon prélevé dans le cadre d'un plan de surveillance ou de contrôle (PS/PC), confiée par la DGAL au CNRL pour intégration dans la surveillance nationale.

Dans le cadre du PS/PC, le LNRL a partagé, pour l'année 2022, 36 séquences génomiques avec le CNRL, qui les a intégrés dans la surveillance nationale.

#### - Nombre de souches et distribution par espèce

Sur un total de 844 (2021: 946) souches d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2022, 833 ont été identifiées comme *L. monocytogenes*. Pour aucun envoi (2021:4), les souches n'ont pas pu être analysées (Tubes cassés durant le transport, tubes non ensemencés par le laboratoire expéditeur).

Entre 2022, aucune souche (2021: 2) n'appartenait pas au genre *Listeria* (25).

En 2022 la répartition par espèce des 11 souches de non-*L. monocytogenes* d'origine alimentaire (2021 : 15) était la suivante: *L. innocua*, 82% (2021: 87%) ; *L. ivanovii*, 1% (2021: 13%); *L. welshimeri*, 1% (2021, 0%).

L'identification des espèces par spectrométrie de masse MALDI-ToF est confirmée par l'analyse ANIb (Average Nucleotide Identification by BLAST) des séquences génomiques des souches.

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

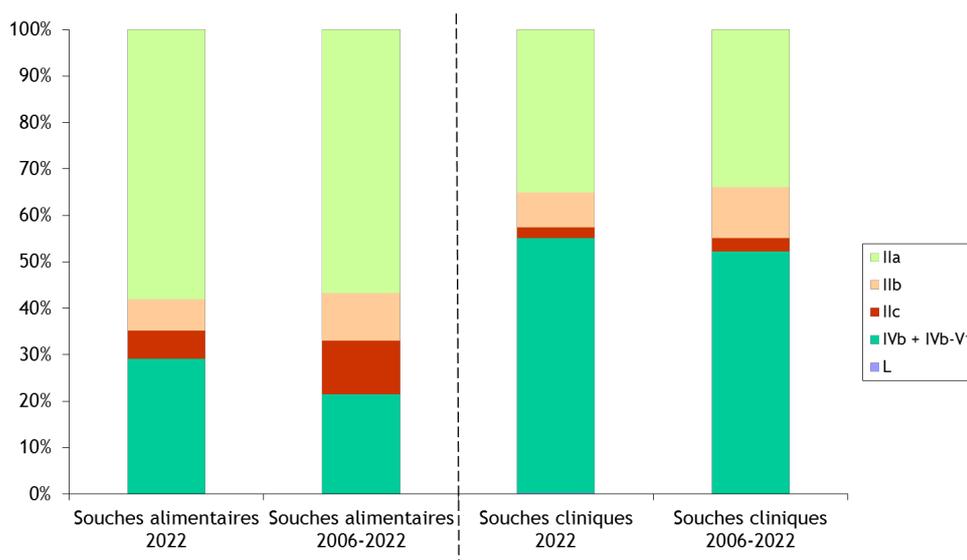
La répartition par catégories d'aliments des 833 souches de *L. monocytogenes* d'origine alimentaire reçues au CNRL en 2022 (2021 : 925) était la suivante: lait et produits laitiers (39 %) [2021: 30%], viande et produits carnés (27%) [2021: 32%], produits de la pêche (9%) [2021: 9%]; végétaux (7%) [2021: 4%], autres aliments (15%) [2021:8%], et sans information (3%) [2021: 2%].

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

#### - Distribution des souches alimentaires de *Lm* par sérotype PCR

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

Comme l'illustrent la Figure 17 et le Tableau 5, le sérotype PCR IVb (sérovars 4b, 4d et 4e) représente 25% des souches alimentaires analysées (26% en 2021), en légère augmentation (18-20% des souches isolées d'aliments de 2011 à 2021), alors qu'il est le groupe le plus fréquemment impliqué dans les cas humaine. En revanche, le groupe IIc, très présent dans les aliments, est très rare en clinique. Ceci suggère une virulence accrue des souches du groupe IVb par rapport aux autres (21, 22, 26-28), ce que nous avons démontré expérimentalement (21, 22, 26-28).



**Figure 17.** Distribution par sérotypes PCR des souches de *Lm* cliniques et alimentaires en 2022 et entre 2006 et 2022

**Tableau 5.** Distribution par groupes PCR et catégories d'aliments des souches alimentaires de *Lm* reçues au CNRL en 2022

Sérogroupe PCR	viande et produits carnés	lait et produits laitiers	produits de la pêche	végétaux	autres aliments	origine non précisée	Total	Souches humaines
IIa	160	158	63	34	50	19	<b>484 (58%)</b>	<b>151 (35%)</b>
IIb	8	43	2	1	2	0	<b>56 (7%)</b>	<b>32 (7%)</b>
IIc	35	4	0	1	10	0	<b>50 (6%)</b>	<b>10 (2%)</b>
IVb + IVb-v1	22	122	14	19	61	4	<b>242 (29%)</b>	<b>236 (55%)</b>
L	10	1	0	0	0	0	<b>1 (&lt;1%)</b>	<b>1 (&lt;1%)</b>
<b>Total</b>	<b>226</b>	<b>328</b>	<b>79</b>	<b>55</b>	<b>123</b>	<b>23</b>	<b>833</b>	<b>430</b>

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

Les résultats de typage MLST des souches alimentaires sont présentés dans la Figure 15. Entre 2017-2021, certains complexes clonaux, comme CC121 (21%; 2021: 20%) et CC9 (6%; 2021: 8%) sont surreprésentés parmi les souches alimentaires et sont hypovirulents (39, 50), mais depuis 2022 le clone CC6 représente 8% des CC (contre 6% de 2017-2021). À l'inverse en 2022, les clones CC1 18% (2021: 16%), CC6 14% (2021: 14%) et CC4 10% (2021: 13%) sont surreprésentés dans les cas humains, et sont hypervirulents (39, 50).

Les CCs les plus fréquents dans les aliments étaient par ordre décroissant de 2017 à 2022 : CC121, CC9, CC8, CC1, CC6, CC4 et CC37.

### Souches isolées de l'environnement de production alimentaire industrielle

En 2022, 312 souches (2021: 326) provenant de l'environnement de production alimentaire ont été reçues au CNRL, adressées par des laboratoires vétérinaires départementaux (19%, 2021: 17%), des laboratoires privés (78%, 2021: 79%), des laboratoires de la DGCCRF (0%; 2021: 2%), et de l'ANSES (LCSSV) (3%, 2021: 2%). Il s'agit principalement d'échantillons prélevés sur des surfaces dans des industries agroalimentaires et des suites de signalements dans le cadre de l'instruction technique DGAL/SDSSA/2019-555 ou isolées de réfrigérateurs dans le cadre d'enquêtes alimentaires.

Ces 312 souches de *Listeria* appartenaient en 2022 (2021: 326) à l'espèce *L. monocytogenes* (97%; 2021:95%), *L. innocua* (1%; 2021:3%), *L. welshimeri* (1%; 2021:1%), *L. ivanovii* (<1%; 2021: <1%); et 2 (en 2021: 0) souches non-*Listeria* (*Enterococcus faecalis*).

La répartition par sérogroupe PCR des 312 souches de *Lm* environnementales isolées respectivement en 2022 (311 en 2021), est la suivante par sérogroupe PCR: IIa (68%; 2021: 62%), IIb (6%; 2021: 8%), IIc (7%; 2021: 5%); IVb (18%; 2021: 24%) et L (<1%; 2021: <1%). Les souches des groupes PCR IIa, IIc, et IIb sont majoritaires et représentent 81% (2021: 80 %) des souches.

En 2022 les CCs les plus fréquents dans l'environnement de production alimentaire étaient CC121, 20% (2021: 20%), CC8, CC204 et CC9.

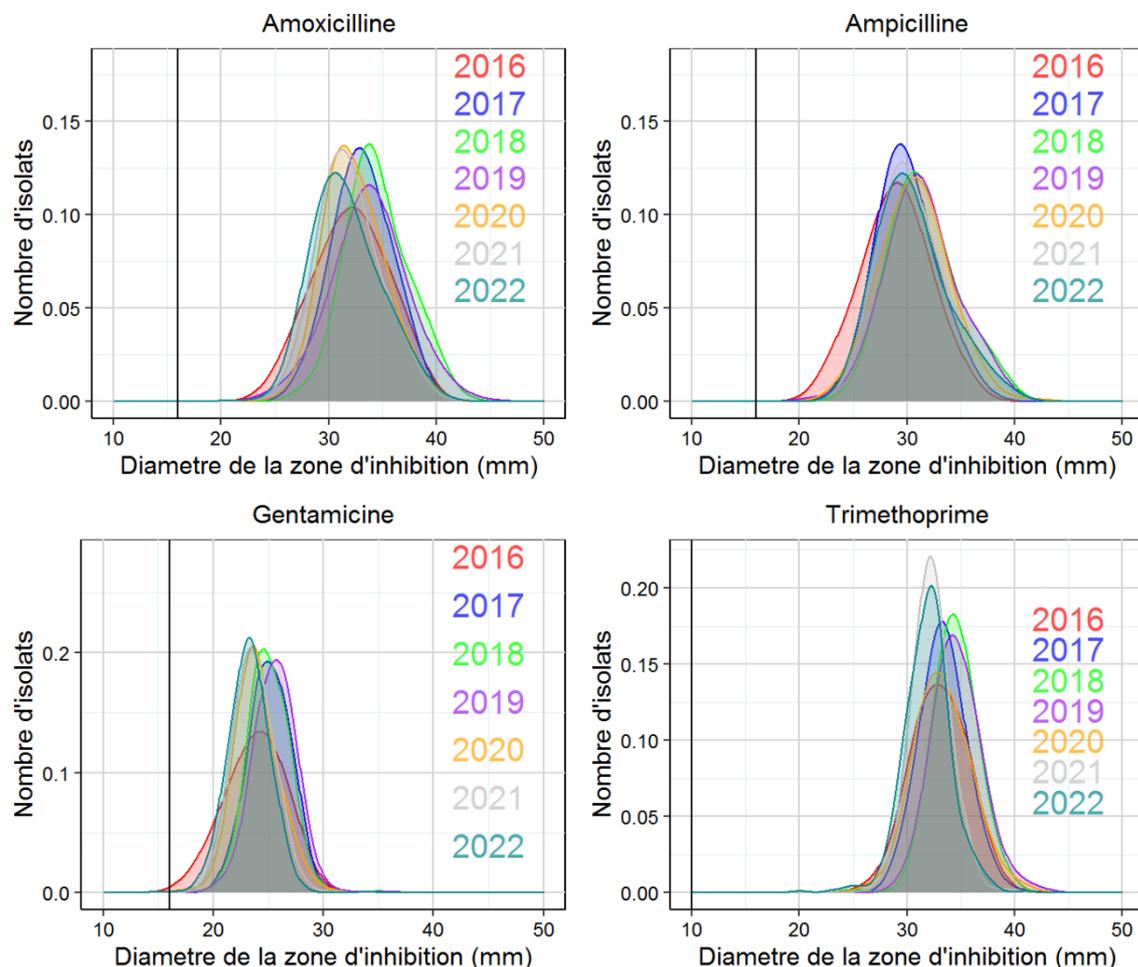
### 3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

*Lm* présente une résistance naturelle in vitro aux céphalosporines de 3e génération, à la clindamycine, à la fosfomicine, aux sulfonamides et à l'acide nalidixique.

En 2022, toutes les souches humaines reçues au CNRL étaient sensibles à l'ampicilline, à l'amoxicilline, à la gentamicine (Figure 18), à l'imipénème, à l'acide fusidique, à la pénicilline, au chloramphénicol (29), à l'érythromycine, à la moxifloxacine, à la lévofloxacine, à la vancomycine, à la ciprofloxacine, à la rifampicine, au

triméthopriane, à la kanamycine et la streptomycine. La résistance à la tétracycline a été observée chez 2 souches humaines (2021: 3), associée à la présence du gène de résistance *tetM*. Aucune association entre les complexes clonaux MLST et les résistances n'a été observée.

L'analyse des génomes des souches alimentaires et environnementales a permis de détecter la présence des gènes suivants: *ermB*, impliqué dans la résistance à l'érythromycine (2022: 2, 2021: 0); *tetM*, impliqué dans la résistance à la tétracycline (2022, 7; 2021: 4) et *InuA*, impliqué dans la résistance aux lincosamides (2022 : 1).

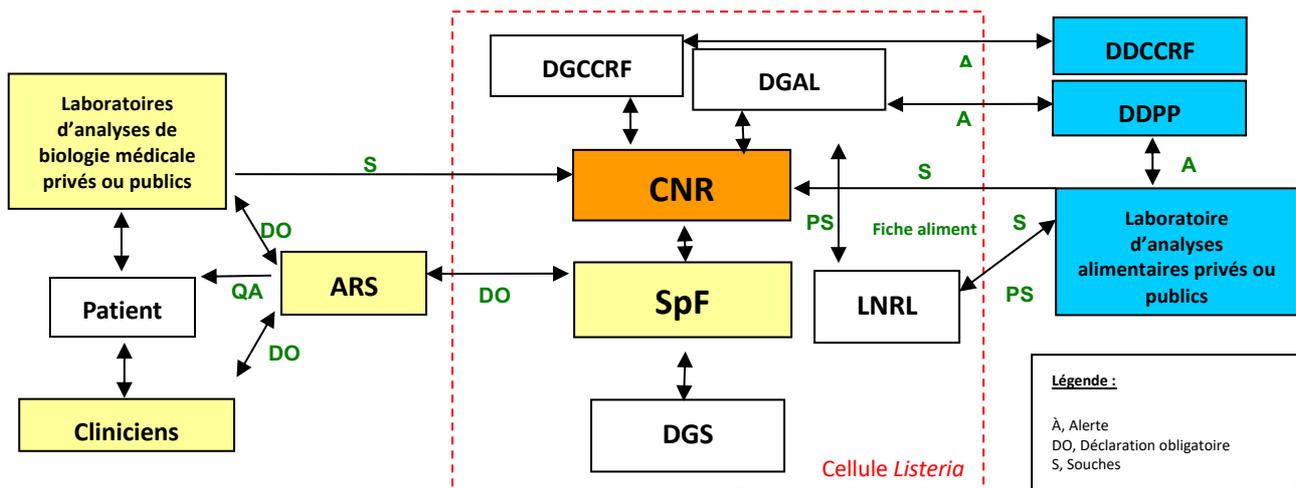


**Figure 18.** Distribution des diamètres des zones d'inhibition pour l'ampicilline, l'amoxicilline, la gentamicine et le triméthopriane des souches reçues entre 2017 et 2022 (Légende: le trait noir indique la valeur de référence EUCAST définissant la résistance).

### 3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

#### 3.4.1. Contribution à la surveillance nationale

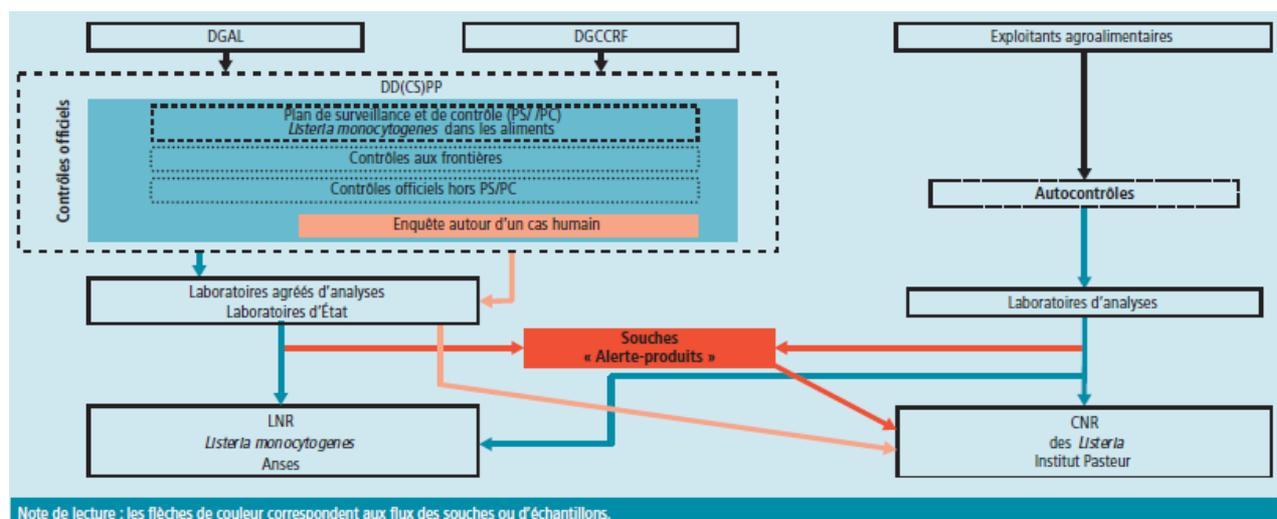
Le CNRL détecte les cas groupés et participe aux investigations destinées à identifier l'origine alimentaire des cas (30). Cette surveillance s'effectue en lien avec SpF, la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) et la Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), qui constituent la Cellule interministérielle *Listeria*, comprenant également la DGS et l'ANSES (Figure 19). Ses missions sont (i) la détection des cas groupés de listériose, (ii) la proposition et la coordination des investigations et actions à mettre en œuvre devant des cas groupés potentiellement liés à une source commune de contamination, (iii) leur gestion et leur prévention. Le rôle du CNRL dans la surveillance est présenté dans la Figure 19.



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

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

Le circuit des souches d'origine alimentaire ou environnementale est présenté à la Figure 20.



**Figure 20.** Circuit des souches sur le schéma de surveillance microbiologique français des *Listeria monocytogenes*, tel que formalisé par la Cellule *Listeria* (Source: BEH. 2012. Surveillance des *L. monocytogenes* dans les aliments. Hors-Série: 41-45 (31))

#### 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.

L'activité de surveillance du CNRL consiste à :

1. Confirmer l'identification de la souche ;
2. Analyser les caractéristiques microbiologiques (sérotype PCR, MultiLocus Sequence Typing (MLST), core génome MLST (cgMLST), sensibilité aux antibiotiques et aux désinfectants) des souches isolées de cas humains, d'aliments ou d'environnement agroalimentaires ;

3. Recueillir les informations cliniques associées aux cas ou aux souches d'aliments ou d'environnement agroalimentaires au moyen d'une fiche de renseignements.

Ces éléments permettent :

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

## **SURVEILLANCE ET CLUSTERS**

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

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

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

### 2. Surveillance microbiologique hebdomadaire

Le CNRL effectue chaque semaine un tableau de suivi des clusters envoyé à SpF, la DGAL et la DGCCRF, regroupant le numéro de CLIP CNRL, les types cgMLST, le détail d'alertes produits, et leur appartenance à des clusters définis par le CNRL. Ce tableau signale aussi les caractéristiques microbiologiques similaires des souches françaises à des alertes européennes ou internationales.

### 3. Surveillance renforcée

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

### 4. Phase d'alerte

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

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

### 5. Cas sporadiques, groupés et épidémies

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

cgMLST, dont l'éradication pourrait avoir un impact sur la contamination alimentaire et le nombre de cas de listérioses.

#### 6. Toxi-infection alimentaire collective

Il s'agit de la survenue d'au moins deux cas de gastro-entérite à *Lm* dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

#### 7. Alertes nosocomiales

La détection d'infections nosocomiales déclenche une notification à SpF et une enquête impliquant SpF, l'ARS, la DGAL/DDPP et le CNRL ainsi que le CLIN et l'hygiéniste hospitalier concerné est conduite pour identifier l'origine (interne ou externe) de l'infection.

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

### 3.4.1.1. Contribution à la surveillance alimentaire

#### *Les alertes-produits*

Une alerte produit est déclenchée quand une denrée alimentaire non-conforme aux critères microbiologiques de sécurité du règlement européen 2073/2005 modifié (100 UFC/g ou absence/présence) (32, 33), 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) (32, 33). Le CNRL transmet chaque semaine la mise à jour des clusters cgMLST aux membres de la Cellule *Listeria*. SpF investit principalement les clusters cgMLST reliés à au moins une souche d'alerte produit.

#### *Les enquêtes autour d'un cas de forme neuroméningée*

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

### 3.4.2. Interface avec les acteurs nationaux et internationaux

**SpF** : Le CNRL est en lien quotidien avec SpF pour la surveillance le suivi de dossiers (souches humaines, investigations), la gestion de phénomènes anormaux et les éventuelles alertes déclenchées par la surveillance des informations françaises sur *Listeria*.

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

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

**ECDC:** L'ECDC a mis en place un système volontaire d'investigations de cas groupés ou d'épidémies européens au moyen de la plateforme d'échanges EPIS (Epidemic Intelligence Information System) devenu EPIPULSE en 2021, ouverte aux 27 pays européens et à 51 pays non-européens. Le CNRL, en relation avec SpF, répond à toutes les alertes déposées sur la plateforme EPIPULSE (cf. chapitre 4.7) pour un échange de données de typages et d'informations concernant les cas groupés et les épidémies.

Le CNRL a aussi participé :

- au groupe de travail *Listeria* du réseau européen des maladies d'origine hydrique et alimentaire (FWD) (M. Lecuit & A. Leclercq) ;
- à la transmission des données françaises pour la base TESSY ;
- à l'expertise de certaines alertes en relation avec des urgent inquiries ECDC (Chapitre 4.5.). Le CNRL a communiqué des séquences génomiques françaises dans le cadre des alertes européennes EPIPULSE si demandés par le pays concerné et avec autorisation des autorités compétentes.
- à la réunion d'information ECDC/Santé Publique France du 30/06/22 sur « Les nouvelles initiatives européennes en matière de sécurité sanitaire et réponse aux crises et le nouveau mandat de l'ECDC »
- à la relecture du rapport ECDC/EFSA « The European Union One Health 2021 Zoonoses Report » pour le chapitre *Listeria monocytogenes*,  
[https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/EFS2\\_7666\\_Rev3.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/EFS2_7666_Rev3.pdf)
- à la relecture du rapport ECDC « Listeriosis – Annual Epidemiological Report for 2021 »,  
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER%20listeriosis%20-%202021.pdf>
- à l'étude ECDC « Eight external quality assessment scheme for *Listeria monocytogenes* typing »,  
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/8th-EQA-scheme-Listeria.pdf>
- au 11eme meeting annuel du FWD network sur "Tools and developments in WGS-supported surveillance of FWD", 30-31 Mars 2022;

**DG SANTE (RASFF) :** Le réseau RASFF de l'Union européenne est un outil d'échange d'informations pour garantir la sécurité alimentaire : les notifications d'alertes (produits alimentaires à risque sur le marché nécessitant une action immédiate) et notifications (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 (DGAL, DGCCRF, SpF), qui les communiquent au CNRL. Ce système est complété par le réseau INFOSAN de l'OMS.

**CEN (Comité Européen de Normalisation) :** En 2019 et 2020, le CNRL a participé en normalisation de la Microbiologie de la chaîne alimentaire concernant *Listeria* :

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

**EURL-Lm :** Le laboratoire de référence des *Listeria* de l'Union européenne (EURL-Lm) est également LNRL. En 2022, l'EURL-Lm a sollicité le CNRL dans le cadre d'analyses effectuées par le CNRL pour les différentes alertes européennes, les génomes de ces souches ont été transmis à l'EURL-Lm.

#### **SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE INTERNATIONALE DE LA LISTERIOSE**

##### **OMS**

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

Son mandat a été renouvelé le 01 Novembre 2019.

Dans ce cadre, le CNRL participe à la surveillance internationale de la listériose et de la résistance aux agents antimicrobiens des *Listeria*, à la collecte de données pour l'analyse des risques réalisée par l'OMS et à la formation des personnels qui le contactent (34, 35).

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

En 2022, le CNRL/CCOMS a participé :

- à l'accueil des stagiaires comme décrit au point 5.1.2. de ce rapport ;
- A. Leclercq a participé aux groupes d'experts JEMRA FAO/OMS [Rapport publié: FAO and WHO. 2022. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: attribution, characterization and monitoring – Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No. 38. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc2400en> ]

### 3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- **MONALISA** : Les inclusions dans la cohorte MONALISA (Multicentric Observational National Analysis of LIsteriosis and *Listeria* ; Charlier et al., *Lancet Infect Dis* 2017) se poursuivent.

- **MONALISA-BABY** : L'analyse du devenir à 5 ans des enfants avec listériose périnatale financée, met en évidence la présence de séquelles neurocognitives à long terme chez 66% des enfants survivants, et la contribution prédominante de la de la prématurité dans ces séquelles.

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

- **MONALISA-GENBIO** : Etude de la susceptibilité génétique de l'hôte vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*, en collaboration avec l'équipe de génétique humaine évolutive (Lluis Quintana, Etienne Patin, Institut Pasteur) et celle de Dusan Bogunovic (Mount Sinai Hospital, NYC, USA).

## 4. Alertes

---

L'ensemble du système de surveillance et d'alerte français est décrit dans le chapitre 3.4.

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

### 4.1 Suspensions d'infections nosocomiales

En 2022, la possibilité de listériose nosocomiale (la mise en évidence de cas de listériose groupés temporellement et géographiquement (même hôpital, voire même service)) a été évoquée après 15 jours d'hospitalisations dans 44 cas (27 en 2021) (36, 37). Dans 9 cas, des souches formaient un cluster qui a été investigué.

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

- La nécessité de ne pas mettre dans la même pièce des enfants dont un est atteint de listériose ;
- Ne pas proposer de fromage au lait cru dans les établissements de santé type EHPAD, qui hébergent des patients à risque de listériose ;
- La nécessité de communiquer au CNRL l'ensemble des souches prélevées dans le cadre des prélèvements d'environnement des cuisines d'établissements de soins ;
- La gestion particulière des investigations dans des cuisines centrales de centres hospitaliers des grandes villes ;
- L'application de la bonne méthodologie de prélèvement des échantillons d'environnement ;
- Les renseignements apportés par le CNRL sur la tolérance aux désinfectants ce qui a permis d'adapter la procédure de nettoyage-désinfection en conséquence pour éliminer la souche ;
- La possibilité d'échanger avec des homologues étrangers en cas d'établissements frontaliers ;
- Considérer le céleri comme un aliment à risque pour les établissements de soins suite à plusieurs épisodes de contamination en établissements de soins en France et aux USA, à intégrer au questionnaire alimentaire.

Le CNRL a publié avec SpF et l'hôpital concerné un cas de contamination croisée entre deux enfants dans une maternité (Charlier *et al.*, *Cell Med Rep* 2023) et mis en évidence l'immaturation du microbiote intestinal des nouveau-nés comme un facteur clé de susceptibilité à la transmission horizontale de *L. monocytogenes*.

### 4.2 Cluster cgMLST

Après une phase de développement et de validation débutée en 2015, le CNRL utilise le séquençage du génome complet des souches et la méthode de typage core génome MLST (cgMLST) depuis 2017 pour identifier les clusters de souches humaines et/ou humaines + alimentaires/environnementales (38, 39). L'évolution des clusters et des sources alimentaires identifiés depuis 2015 est présentée dans le tableau 6.

En 2022, le CNRL a identifié 61 [2021: 64] nouveaux clusters et 80 [2021: 72] clusters identifiés avant 2017 ont été actualisés avec l'inclusion de nouvelles souches (humaines, alimentaires ou environnementales). Au total 141 clusters cgMLST (2021: 136) ont été investigués.

**Tableau 6.** Evolution des clusters en France et des sources alimentaires identifiées de 2015 à 2022

Année	Nombre de clusters en cours	% Source identifiée	Nombre de nouveaux clusters	% Source identifiée
2015	0	0	57	12% (n=7)
2016	57	12% (n=7)	66	8% (n=5)
2017	124	11% (n=12)	59	10% (n=6)
2018	183	10% (n=12+6*)	57	27% (n=10)
2019	240	16% (n=28+10*)	69	23% (n=16)
2020	309	18% (n=54+3*)	54	11% (n=6)
2021	434	14% (n=57+4*)	64	7% (n=4)
2022	501	12% (n=61+1*)	61	9% (n=7)

\* sources identifiées durant l'année n-1 dans les clusters en cours

En 2022, ces 141 clusters étaient constitués de 555 souches (2021: 396), dont 211 (2021: 54) souches humaines et 344 (2021: 342) souches non humaines (dont alimentaires: 238 (2021: 276) et environnementales 103 (2021: 66) comprenant 317 (2021 : 298) souches d'alertes produits ou d'investigation autour d'un cas humain.

Parmi les 61 nouveaux clusters cgMLST identifiés en 2022, les investigations menées conjointement par le CNRL, SpF et la DGAL ont permis d'identifier une source de contamination dans 9% (2021: 7%) de ces clusters. En 2022, les nouveaux clusters comportaient de 1 à 8 souches humaines avec une médiane à 1 cas (2021 : 1-7, médiane de 1 cas) et 76% (2021: 75%) avaient moins de 3 souches humaines.

Les clusters sont répartis de la façon suivante:

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

La surveillance génomique permet de s'affranchir des fenêtres temporelles et spatiales et 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 ou réintroduction des souches chez des opérateurs agroalimentaires ou des établissements de soins.

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

L'investigation des clusters conséquents montre l'importance de l'efficacité des plans de nettoyage et désinfection et de la vérification de leur efficacité pour éviter la persistance de *Lm*: produits adaptés par rapport à la tolérance du(es) clone(s) présent(s), personnels formés, nombre d'échantillons prélevés et neutralisants utilisés dans les systèmes de prélèvements des échantillons de surface par les laboratoires.

Le tableau 7 récapitule les épidémies de 1992 à 2022 en France avec identification de la source alimentaire.

**Tableau 7.** Tableau récapitulatif des épidémies françaises de plus de 2 cas de 1992 à 2022 (Source : M. Tourdjman, SpF).

Année	Nombre de cas	Aliments
1992	279	Langue de porc en gelée
1993	38	Rillettes
1995	36	Brie
1997	14	Pont-l'Évêque
1999	4	Époisses
2000	10	Rillettes
2000	32	Langue de porc en gelée
2002	11	Saucisse à tartiner (tartinette)
2003	4	Mortadelle
2012	11	Brie
2013	6	Brebis
2013	11	Quenelles
2013	3	Brebis
2013	2	Brebis
2013	7	Etablissement de soins
2014	2	Maroilles
2014	11	Charcuteries
2015	2	Saint-Nectaire
2015	3	Saint-Nectaire
2015	4	Saint-Nectaire
2015	13	Andouille
2015	2	Saint-Nectaire
2015	3	Fromage de vache
		Contamination d'environnement de production -
2015	2	Artisan
2015	3	Saint-Nectaire
2016	21	Reblochon
2016	2	Brie aux truffes
2016	2	Charcuterie
2016	19	Fromage de vache (TIAC)
2017	2	Reblochon
2018	2	Fromage de chèvre
2018	18	Brie au lait cru
2018	2	Produits traiteurs
2018	3	Boucherie
2018	3	Viande de cheval
2018	2	Céleri
2018	3	Brebis
2019	15	Brie au lait cru
2019	3	Charcuteries
2019	8	Yaourt bio
2019	2	Jambon
2019	2	Etablissement de restauration collective
2019	4	Fromages
2019	4	Etablissement de soins
2019	11	Fromages
2019	10	Charcuteries
2020	4	Charcuteries
2020	4	Truite fumée
2021	2	Fromage de chèvre
2022	6	Fromage de chèvre
2022	5	Substitut de fromage (Vegan)
2022	15	Munster

## 4.3 Toxi-infections alimentaires collectives

La définition officielle des toxi-infections alimentaires collectives n'inclut pas *L. monocytogenes*, ce qui n'exclut pas qu'elle puisse en être responsable.

## 4.4 Alertes-produits DGAL

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

La Mission des urgences sanitaires a recensé 796 alertes nationales en 2021 (rappel : les alertes locales, qui ne touchent qu'un département, ne sont pas traitées par la MUS), toutes origines d'alertes confondues (autocontrôles des professionnels, plans de surveillance et de contrôle officiels...). 124 alertes portaient sur des produits de la pêche et mollusques bivalves vivants. Sur ces 124 alertes, 23% correspondaient à des alertes *Listeria monocytogenes* (soit 29 alertes).

En 2022, 885 souches (2021 : 950) ont été adressées au CNRL dans le cadre des 366 alertes-produits DGAL et DDPP (2021 : 367). Ces souches incluaient 682 souches alimentaires (2021 : 767), et 203 souches d'environnements agroalimentaires (2021 : 183). Le nombre de souches par alerte-produit variait de 1 à 53 (médiane 1). Le nombre de souches envoyées au CNRL par année dans le cadre d'une alerte-produit est stable dans la période 2017-2021 (854 en 2017 vs 885 en 2022).

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

En 2022, à 3 reprises, la DGAL a sollicité des typages génomiques en urgence, dans les alertes produits, réalisé en 4 jours ouvrés et non 9 jours ouvrés en moyenne.

Entre 2022, le taux moyen d'exhaustivité de récupération des souches d'alertes-produits était de 61% (75% en 2021) comme en 2018 malgré une stabilité de 2011 à 2021 (moyenne: 72%).

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

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

En 2022, sur les 869 souches (927 en 2021) de *Lm* isolées d'aliments et d'échantillons environnementaux dans le cadre des alertes-produits, la répartition par séro groupe PCR était la suivante IIa (63%; 60% en 2021), IIb (7%; 8% en 2021), IIc (5%; 7% en 2021), IVb<sub>+IVb-V1</sub> (25%; 25% en 2021) et L (0%; 0% en 2021).

Entre 2017 et 2021, les complexes clonaux de *Lm* les plus fréquents à l'origine d'alertes-produits sont, par ordre décroissant, le CC121, CC9, CC8-16, CC1, CC4, CC6 et CC37, CC5, CC2 alors qu'en 2022, il s'agissait du CC121, CC6, CC8, CC4, CC9, CC37, CC1 et CC14 (2021 :CC121, CC4, CC9, CC1, CC8-16, CC37 et CC6).

Les dénombrements de *Lm* dans les échantillons concernés par les alertes-produits variaient de < 10 à 170.000 UFC *Lm*/g. 118 (32%) alertes-produits (2021: 50; 28%) ont été reliées à un cluster cgMLST avec cas humains.

Comme depuis 2007, ces alertes produits (avec ou sans souche réceptionnée au CNRL) concernaient principalement par ordre décroissant des produits de viandes, surtout des charcuteries, de produits laitiers dont principalement des fromages au lait cru, de produits de la pêche, et de plats préparés. 18 alertes produits concernaient des viandes de poulet ce qui est en augmentation (2021: 17), alors qu'il s'agit d'aliments peu connus pour être contaminés par *Listeria monocytogenes*.

En 2022, le CNRL a communiqué les informations de 34 (2021: 65) souches d'autocontrôles privés étant dans des clusters français en application de la loi EGAlim et du code rural à la DGAL.

## 4.5 Alertes produits DGCCRF

Entre 2022, 1 alerte-produits (charcuterie) provenaient des laboratoires de la DGCCRF et ont donné lieu à la réception au CNRL de 1 souche (2021: 18). 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* (<https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/contamination-des-aliments-a-distribution-par-Listeria-monocytogenes-0>). En 2023, la DGCCRF fusionne avec la DGAL dans le système d'alerte produit de la Police sanitaire.

La synthèse des plans de surveillance et de contrôle de 2021 se trouve à l'adresse :

<https://agriculture.gouv.fr/telecharger/133178>

## 4.6 Enquêtes des formes neuroméningées (dites « enquêtes frigo »)

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

En 2022, 102 listérioses neuroméningées (2021:116) ont été déclarées aux autorités sanitaires. Pour 90 (89%) (2021: 92%, 107), la réalisation de prélèvements alimentaires/environnementaux autour du patient a été demandée. Ces prélèvements ont été réalisés pour 56% (2021: 57%, 66).

Ces 57 cas neuroméningés suivis de prélèvements ont donné lieu à 44 (2021: 61) enquêtes dans le réfrigérateur du patient, 1 (2021: 3) enquêtes en établissements de soins, et 4 (2021: 2) enquêtes en points de vente fréquentés par le patient.

Parmi les 16/44 (36%) (2017-2021: 24%; 2021:23%; 14/61) enquêtes réfrigérateur ayant isolé une souche de *Listeria*, la souche isolée des aliments du frigo était similaire en cgMLST à la souche du patient pour 7 (43%; 2021: 50%, 7)(40).

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

## 4.7 «Urgent Inquiries» de l'ECDC

Entre 2022, le CNRL a été informé d'alertes-produits communautaires soit par l'ECDC au moyen de la plateforme EPIPULSE, soit par la DGAL au moyen du réseau RASFF (alertes-produits), soit par l'OMS/FAO au moyen du réseau INFOSAN Tableau 8). Le CCOMS-CNRL récupère auprès d'opérateurs agroalimentaires étrangers les souches ou leurs génomes d'alertes-produits européennes ou internationales ainsi que les souches des lots incriminés ayant circulé sur le territoire français. Ces souches sont alors introduites dans la

surveillance nationale. Les homologues étrangers du CNRL peuvent aussi lui demander l'envoi de souches ou de génomes dans le cadre de cas groupés ou d'épidémies déclarés par la France ou de RASFF. En accord avec SpF et la DGAL, une réponse sur l'occurrence du cgMLST type dans les souches cliniques et alimentaires françaises est rapportée sur le site EPIS et la séquence est archivée dans le logiciel en ligne BIGSdb *Listeria*.

**Tableau 8.** Liste des Urgent Inquiries auxquelles le CNRL a participé en 2022 (Source : EPIPULSE database, ECDC, Stockholm)

Référence	Titre	Ouverture	Pays	cgMLST type	Souches françaises
2022-FWD-00010	<i>Listeria</i> cluster possibly related to fish consumption	03/08/22	Hollande	L2-SL378-ST2894-CT3909	0
2022-FWD-00018	<i>Listeria monocytogenes</i> cluster in the US	13/06/22	Etats-Unis	L1-SL1-ST1-CT11192	1
2022-FWD-00022	<i>Listeria monocytogenes</i> CC217 ST217 outbreak in the United Kingdom	07/09/22	Royaume-Uni	L1-SL217-ST217-CT8536	1
2022-FWD-00040	<i>Listeria monocytogenes</i> ST37 outbreak in Denmark	07/09/22	Danemark	L2-SL37-CT37-CT11588	0
2022-FWD-00043	<i>Listeria monocytogenes</i> ST8 outbreak in Denmark	16/12/22	Danemark	L2-SL8-ST8-CT11672	0
2022-FWD-00047	<i>Listeria monocytogenes</i> cluster in the US Linked to Ice Cream	16/12/22	Etats-Unis	L1-SL5-ST5-CT11729	0
2022-FWD-00049	<i>Listeria monocytogenes</i> cluster in the US and Canada	16/12/22	Etats-Unis	L1-SL388-ST388-CT2367	0
2022-FWD-00053	Outbreak of infections with <i>Listeria monocytogenes</i> ST155	13/03/23	Italie	L2-SL155-ST155-CT8026	2
2022-FWD-00059	Cluster of <i>Listeria monocytogenes</i> ST155 in Austria	20/10/22	Autriche	L2-SL155-ST155-CT9829	1
2022-FWD-00070	<i>Listeria monocytogenes</i> ST1 outbreak in Austria	20/10/22	Autriche	L1-SL1-ST1-CT12364	0
2022-FWD-00074	<i>Listeria monocytogenes</i> ST121 cluster in Norway	15/11/22	Norvège	L2-SL121-ST121-CT12417	0
2022-FWD-00076	<i>Listeria monocytogenes</i> cluster in the US and Canada, source unknown	16/12/22	Etats-Unis	L2-SL451-ST451-CT12438	0
2022-FWD-00077	<i>Listeria monocytogenes</i> ST7 cluster in Denmark	15/11/22	Danemark	L2-SL7-CC7-CT12454	0
2022-FWD-00081	<i>Listeria</i> ST8 outbreak	09/01/23	Italie	L2-SL8-ST8-CT750	0
2022-FWD-00089	Listeriosis Outbreak Germany	05/12/22	Allemagne	L2-SL101-ST101-CT12799	0
2022-FWD-00093	<i>Listeria monocytogenes</i> cluster in the US linked to enoki mushrooms	16/12/22	Etats-Unis	L2-SL91-ST91-CT8302	0
2022-FWD-00094	<i>Listeria monocytogenes</i> ST26 cluster in Hungary	05/01/23	Hongrie	L2-SL26-ST26-CT12856	0
2022-FWD-00097	Cluster of <i>Listeria monocytogenes</i> ST155 in Austria	30/01/23	Autriche	L2-SL155-ST155-CT12891	0
2022-FWD-00099	Listeriosis outbreak Pi8	30/01/23	Allemagne	L1-SL5-ST5-CT12927	0
2022-FWD-00100	Listeriosis cluster Epsilon1b	29/03/23	Allemagne	L1-SL6-ST6-CT443	0
2022-FWD-00102	Cluster of listeriosis cases linked to vegan organic cheeses made from almond milk from a French producer	26/01/23	France	L2-SL475-ST504-CT11461	5

En 2022, le CNRL a investigué 21 « urgent inquiries » (2021 : 23) de l'ECDC (communiquées sur la base EPIS/EPIPULSE) dont 1 émise par la France sur des substituts de fromage Vegan (Tableau 8). Dans chaque cas, en lien avec SpF et la DGAL/DGCCRF, le CNRL communique sur EPIS/EPIPULSE une synthèse des souches d'origines humaine et alimentaire du même type cgMLST que la souche/les souches investiguées et met à disposition les séquences des souches françaises à l'ECDC ou à l'EURL-*Lm* avec les métadonnées si autorisation des autorités compétentes françaises. L'ECDC/EFSA rédige une Joint Notification Summary et une publication Rapid Risk Assessment sur ces urgent inquiries associés ou non à un RASFF qui sont publiques sur le site de l'ECDC ou confidentiels.

## 4.8 Epidémie

En 2022, le CNRL a participé à la gestion de 2 épidémies.

- Cluster FR\_461 (cgMLST L2-SL475-ST504-CT11461), EPIPULSE 2022\_FWD\_00102 ECDC – Décembre 2022, Substitut de fromage Vegan
- Cluster FR\_369 (cgMLST L1-SL1-ST1-CT7683) – Septembre 2022, Fromage Munster

## 4.9 Enquête judiciaire

Depuis 2017, des demandes (8) auprès de SpF de restitution de rapports individuels d'investigations autour d'un cas ont été faites par les autorités judiciaires dans le cadre de procédures intentées par un cas ou son entourage, et des particuliers souhaitant obtenir les résultats des investigations effectuées à leur domicile.

## 5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

---

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

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

Le CNRL/CC-OMS *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. Le CNRL procure environ 60 documents/an à des chercheurs, praticiens ou opérateurs agroalimentaires.

### 5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

#### *Enseignements, Formations*

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

En 2022, Marc Lecuit a encadré des étudiants ou a réalisé les enseignements suivants :

- Cours en Master 1 et 2 de Microbiologie et Biologie cellulaire, Université Paris Cité, Sorbonne Université, ENS.
- Cours de Maladies infectieuses et Microbiologie, Faculté de Médecine de l'Université de Paris-Cité.

En 2022, Caroline Charlier a encadré des étudiants ou a réalisé les enseignements suivants :

- Encadrement d'une thèse d'exercice de médecine.
- Participation au jury d'une thèse de médecine, 2 thèses d'université.
- Conférences sur la listériose en premier, deuxième et troisième cycle d'études médicales, en formation initiale et continue (20H/an).

#### *Accueil de stagiaire*

En 2022, le CNRL a accueilli le Dr Pedro Vallejo, resident of clinical microbiology, Donostia Hospital, Spain, pour une formation sur l'analyse des génomes de souches humaines espagnoles.

#### *Liste des guides élaborés*

Cf. chapitre 6.2.

#### *Rétro-information aux partenaires*

Le retour d'information prend plusieurs formes:

1. Compte-rendu détaillé des analyses effectuées pour chaque souche envoyée au laboratoire expéditeur. En cas d'atypies sur la souche ou l'observation médicale, le laboratoire expéditeur est contacté par l'un des responsables pour échanges d'informations.
2. Publication des formes atypiques de listérioses.

3. Communications orales dans plusieurs congrès nationaux et internationaux des travaux de recherche du CNRL (e.g. ISOPOL, RICAI).

Depuis 2007, le rapport d'activité du CNRL est mis en ligne (<http://www.pasteur.fr/cnr/listeria> rubrique « actualités-Rapports »), après validation de l'activité de l'année concernée par le comité des CNR.

#### **Site internet**

Le CNRL/CC-OMS *Listeria* dispose d'un site internet en français et anglais: (<http://www.pasteur.fr/cnr/listeria>) et est au minimum actualisé tous les 6 mois.

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

Comme de 2017 à 2021, le CNRL a reçu en moyenne 182 demandes d'information des professionnels de santé, de l'alimentaire, des particuliers, des scientifiques et des étudiants par e-mail ([listeria@pasteur.fr](mailto:listeria@pasteur.fr)) (~3/semaine) et environ 400 appels téléphoniques (~8/semaine) (cf. point 4.7 "Prestations de conseils » de la norme NF EN ISO 15189) et point 4.4. "Revue de contrat » de la norme NF EN ISO 17025).

Par ailleurs, de nombreux biologistes et cliniciens 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.

## **5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires**

#### **Veille Internet**

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

#### **Expertises dans des comités nationaux, européens ou internationaux**

Les responsables du CNRL ont participé, en tant qu'experts ou conseillers, à différentes instances: ECDC groupe *Listeria*, groupe de travail permanent de la Coordination des Laboratoires de Référence et d'Expertise (Institut Pasteur), Réseau de Microbiologistes Médicaux (R2M), Comité Européen de Normalisation en microbiologie de la chaîne alimentaire CEN TC463, Comité français Afnor V08B, Comité International de normalisation en microbiologie des aliments ISO TC34/SC9, et groupe d'experts JEMRA FAO/OMS comme décrit précédemment.

#### **Conseil auprès de Ministères**

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

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

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

## 5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

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

En 2022, les responsables du CNRL ont participé aux réunions concernant l'application des normes françaises, européennes et internationales pour les *Listeria* en microbiologie de la chaîne alimentaire.

### *Expertise de publications et de projets scientifiques*

En 2022, le CNRL a participé à l'examen d'articles (>22) dans des journaux nationaux et internationaux à comités de lecture (*PLOS One*, *PLOS pathogens*, *Lancet Infectious Diseases*, *Frontiers in Microbiology*, *Microbiology Spectrum*, , *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *International Journal of Food Microbiology*, *Foodborne Pathogens and Disease*, *Genes*, *Food Research International*, *International Journal of Infectious Diseases*, *Journal of Food Protection*, *Food Control*, *BMJ Case Reports*). Il a également expertisé des projets scientifiques.

M. Lecuit est membre du comité éditorial de *Virulence*, *Journal of Visualized Experiments*, *F1000 research*, *Microbial Pathogenesis*, éditeur associé, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, membre Comités éditoriaux. C. Charlier est éditeur pour la section « Maladies Infectieuses » de la Presse médicale, et A. Leclercq est membre du comité éditorial de « *Journal of Food Protection* », « *Food Analytical methods* », « *International Journal of Food Microbiology* », « *Frontier Microbiology* ». M. Lecuit est membre des conseils scientifiques de la Fondation pour la Recherche Médicale, de la Ville de Paris, de la Fondation Bettencourt Schueller et de la Fondation Louis Jeantet, membre du Panel LS6 StG de l'ERC et du comité de sélection des GIN de l'EMBO.

## 6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

---

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

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

### 6.1 Activités de recherche en 2022 ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

#### 6.1.1. Contributions aux études épidémiologiques, microbiologiques et cliniques

##### *In vitro and in silico parameters for precise cgMLST typing of Listeria monocytogenes*

*En collaboration avec F. Palma, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "Giuseppe Caporale" (IZSAM), National Reference Centre (NRC) for Whole Genome Sequencing of microbial pathogens: database and bioinformatics analysis (GENPAT), Teramo, Italie.*

*Article : Palma F, Mangone I, Janowicz A, Moura A, Chiaverini A, Torresi M, Garofolo G, Criscuolo A, Brisse S, Di Pasquale A, Cammà C, Radomski N. In vitro and in silico parameters for precise cgMLST typing of Listeria monocytogenes. BMC Genomics. 2022 Mar 26; 23(1):235. doi: 10.1186/s12864-022-08437-4.*

Abstract:

**Background:** Whole genome sequencing analyzed by core genome multi-locus sequence typing (cgMLST) is widely used in surveillance of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*. Given the heterogeneity of available bioinformatics tools to define cgMLST alleles, our aim was to identify parameters influencing the precision of cgMLST profiles.

**Methods:** We used three *L. monocytogenes* reference genomes from different phylogenetic lineages and assessed the impact of in vitro (i.e. tested genomes, successive platings, replicates of DNA extraction and sequencing) and in silico parameters (i.e. targeted depth of coverage, depth of coverage, breadth of coverage, assembly metrics, cgMLST workflows, cgMLST completeness) on cgMLST precision made of 1748 core loci. Six cgMLST workflows were tested, comprising assembly-based (BIGSdb, INNUENDO, GENPAT, SeqSphere and BioNumerics) and assembly-free (i.e. kmer-based MentaLiST) allele callers. Principal component analyses and generalized linear models were used to identify the most impactful parameters on cgMLST precision.

**Results:** The isolate's genetic background, cgMLST workflows, cgMLST completeness, as well as depth and breadth of coverage were the parameters that impacted most on cgMLST precision (i.e. identical alleles against reference circular genomes). All workflows performed well at  $\geq 40X$  of depth of coverage, with high loci detection ( $> 99.54\%$  for all, except for BioNumerics with  $97.78\%$ ) and showed consistent cluster definitions using the reference cut-off of  $\leq 7$  allele differences.

**Conclusions:** This highlights that bioinformatics workflows dedicated to cgMLST allele calling are largely robust when paired-end reads are of high quality and when the sequencing depth is  $\geq 40X$ .

## **FAO and WHO: *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: attribution, characterization and monitoring**

Participation d'A. Leclercq aux groupes d'experts JEMRA FAO/OMS

Rapport publié: FAO and WHO. 2022. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: attribution, characterization and monitoring – Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No. 38. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc2400en>.

**Abstract:** A virtual meeting of the Joint FAO/WHO Expert Meeting on Microbiological Risk Assessment (JEMRA) of *Listeria monocytogenes* (hereinafter referred to as “*L. monocytogenes*”) in ready-to-eat (RTE) foods: attribution, characterization and monitoring was held from 20 October to 6 November 2020. The purpose of the meeting was to review recent data on *L. monocytogenes* and determine the need to modify, update, or develop new risk assessment models and tools for this pathogen. A public call for data and experts was issued to support this work. In addition, background documents on the various aspects related to the meeting were prepared ahead of time for consultation by the experts. Prepared documents included the following: 1) assessment of past JEMRA documentation; “Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods: Interpretative summary (MRA4)” (FAO and WHO, 2004a) and “Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods: Technical report” (MRA5) (FAO and WHO, 2004b); 2) a review of current national *L. monocytogenes* surveillance programmes; 3) a review of current microbiological and laboratory methods for *L. monocytogenes*; and 4) an update on the virulence markers for *L. monocytogenes*. The meeting participants reviewed the prepared summary documents and other information on outbreaks and disease attribution, virulence, population risk factors, advances in laboratory methods and surveillance. The aforementioned risk assessment documents (MRA4, MRA5) (FAO and WHO, 2004a, 2004b) covered a cross-section of RTE foods (pasteurized milk, ice cream, cold smoked fish and fermented meats) linked to invasive listeriosis. Since the publication of these documents, outbreaks of listeriosis continue to occur across the globe associated with previously reported foods, but also with many previously unreported food vehicles, including fresh and minimally processed fruits and vegetables (e.g. frozen vegetables). The expert group concluded that it would be wise to be more inclusive in future risk assessments and that a full farm-to-fork risk assessment be considered. *L. monocytogenes* can infect anyone; however, it continues to disproportionately affect certain highly susceptible populations. The expert group recommended that future risk assessments should review groupings of susceptible groups, based on physiological risks and other socio-economic factors. New information has emerged on *L. monocytogenes* strain variants, which differ in their virulence and environmental tolerance. Based on a panel of specific genes, the expert group proposed a virulence ranking of *L. monocytogenes* relevant to invasive listeriosis. The expert group concluded that the development and implementation of effective surveillance systems are critical in addressing the control of *L. monocytogenes*. The use of approved standardized laboratory methods that culture and isolate strains should be the foundation so that human, food and environmental isolates can be further characterized and inventoried.

In conclusion, the expert group identified several critical gaps in the current FAO/WHO risk assessment model and collectively agreed that updating the model would be valuable for informing risk analysis strategies, including in low- and middle-income countries (LMICs). The experts prepared short examples from literature (Annex 1) to demonstrate and highlight several key principles that should be considered in the risk assessment for *L. monocytogenes*.

## **Genomic characterization of *Listeria* spp. isolated from tonsils, udder and feces of domestic dairy ruminants in Spain**

En collaboration avec JJ. QUEREDA (Faculté Vétérinaire, Valence, Espagne)

Article publié : Palacios-Gorba C, Moura A, Markovich Y, Tessaud-Rita N, Gómez-Martín Á, Bracq-Dieye H, Gomis J, Vales G, Pastor-Martín M, Thouvenot P, Escrig C, Leclercq A, Lecuit M, Quereda JJ. Genomic characterization of *Listeria* spp. isolated from tonsils, udder and feces of domestic dairy ruminants in Spain. *Microbes Infect.* 2023 May;25(4):105079. doi: 10.1016/j.micinf.2022.105079.

**Abstract:** Two species of *Listeria* are pathogenic, *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. Although studies have shown that dairy ruminants shed *Listeria* spp. in feces, there is little information about ruminants that do

not shed *Listeria* spp. in their feces but asymptotically carry them in organs. We evidence that ruminants can asymptotically carry *L. ivanovii* in udders and *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* in tonsils without fecal shedding. Whole-genome sequence of *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* contained known core genes involved in virulence and antibiotic resistance. This work highlights tonsils and udders as a *Listeria* intra-host site of colonization.

### ***Multinational outbreak of Listeria monocytogenes infections linked to enoki mushrooms imported from the Republic of Korea 2016-2020***

*En collaboration avec A. Conrad, Centers for disease control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.*

*Article publié: Pereira E, Conrad A, Tesfai A, Palacios A, Kandar R, Kearney A, Locas A, Jamieson F, Elliot E, Otto M, Kurdilla K, Tijerina M, Son I, Pettengill JB, Chen Y, Fox T, Lane C, Aguillon R, Huffman J, Sheau Fong Low M, Wise M, Edwards L, Bidoi S, Blankenship HM, Rosen HE, Leclercq A, Lecuit M, Tourdjman M, Herber H, Singleton LS, Viazis S, Bazaco MC. Multinational Outbreak of Listeria monocytogenes Infections Linked to Enoki Mushrooms Imported from the Republic of Korea 2016-2020. J Food Prot. 2023 May 9:100101. doi: 10.1016/j.jfp.2023.100101.*

**Abstract:** Keeping the global food supply safe necessitates international collaborations between countries. Health and regulatory agencies routinely communicate during foodborne illness outbreaks, allowing partners to share investigational evidence. A 2016-2020 outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to imported enoki mushrooms required a multinational collaborative investigation among the United States, Canada, Australia, and France. Ultimately, this outbreak included 48 ill people, 36 in the United States and 12 in Canada, and was linked to enoki mushrooms sourced from one manufacturer located in the Republic of Korea. Epidemiologic, laboratory, and traceback evidence led to multiple regulatory actions, including extensive voluntary recalls by three firms in the United States and one firm in Canada. In the United States and Canada, the Korean manufacturer was placed on import alert while other international partners provided information about their respective investigations and advised the public not to eat the recalled enoki mushrooms. The breadth of the geographic distribution of this outbreak emphasizes the global reach of the food industry. This investigation provides a powerful example of the impact of national and international coordination of efforts to respond to foodborne illness outbreaks and protect consumers. It also demonstrates the importance of fast international data sharing and collaboration in identifying and stopping foodborne outbreaks in the global community. Additionally, it is a meaningful example of the importance of food sampling, testing, and integration of sequencing results into surveillance databases.

### ***ChoruMM : a versatile multi-components mixed model for bacterial-GWAS***

*En collaboration avec A. Frouin, F. Laporte et H. Aschard (Department of Computational Biology-USR 3756 CNRS, Institut Pasteur)*

*Article soumis: Arthur Frouin, Fabien Laporte, Lukas Hafner, Mylene Maury, Zachary R. McCaw, Hanna Julienne, Léo Henches, Rayan Chikhi, Marc Lecuit, Hugues Aschard. ChoruMM: a versatile multi-components mixed model for bacterial-GWAS bioRxiv 2023.03.28.534531; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.03.28.534531>.*

**Abstract:** Genome-wide Association Studies (GWAS) have been central to studying the genetics of complex human outcomes, and there is now tremendous interest in implementing GWAS-like approaches to study pathogenic bacteria. A variety of methods have been proposed to address the complex linkage structure of bacterial genomes, however, some questions remain about to optimize the genetic modelling of bacteria to decipher causal variations from correlated ones. Here we examined the genetic structure underlying whole-genome sequencing data from 3,824 *Listeria monocytogenes* strains, and demonstrate that the standard human genetics model, commonly assumed by existing bacterial GWAS methods, is inadequate for studying such highly structured organisms. We leverage these results to develop ChoruMM, a robust and powerful approach that consists of a multi-component linear mixed model, where components are inferred from a hierarchical clustering of the bacteria genetic relatedness matrix. Our ChoruMM approach also includes post-processing and visualization tools that address the pervasive long-range correlation observed in bacteria genome and allow to assess the type I error rate calibration.

### **Draft genome sequence of *Listeria innocua* strain MEZLIS29, isolated from a cow in South Africa**

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

Article: El Zowalaty ME, [Moura A](#), [Lecuit M](#), Zishiri OT. Draft Genome Sequence of *Listeria innocua* Strain MEZLIS29, Isolated from a Cow in South Africa. *Microbiol Resour Announc.* 2022;11(3):e0112221. doi: 10.1128/mra.01122-21.

Abstract: Here, we report the draft genome sequence of *Listeria innocua* strain MEZLIS29, which was isolated from a healthy cow in Flagstaff, Eastern Cape Province, South Africa. The genome was sequenced using the Illumina MiSeq platform and had a length of 2,805,865 bp, with a G+C content of 37.5% and 2,783 coding DNA sequences, 58 tRNAs, 4 noncoding RNAs, and 8 rRNA genes.

### **Genomic surveillance of *Listeria monocytogenes* in Taiwan, 2014 to 2019**

En collaboration avec les Dr YH Tsai, National Yang Ming Chiao Tung University, Taipei, Taiwan, et le Dr. C.S. Chiou, Center for Diagnostics and Vaccine Development, Centers for Disease Control, Taichung, Taiwan.

Article: Tsai YH, [Moura A](#), Gu ZQ, Chang JH, Liao YS, Teng RH, Tseng KY, Chang DL, Liu WR, Huang YT, [Leclercq A](#), Lo HJ, [Lecuit M](#), Chiou CS. Genomic Surveillance of *Listeria monocytogenes* in Taiwan, 2014 to 2019. *Microbiol Spectr.* 2022 Dec 21;10(6):e0182522. doi: 10.1128/spectrum.01825-22.

Abstract: *Listeria monocytogenes* is a life-threatening foodborne pathogen. Here, we report the genomic characterization of a nationwide dataset of 411 clinical and 82 food isolates collected in Taiwan between 2014 and 2019. The observed incidence of listeriosis increased from 0.83 to 7 cases per million population upon implementation of mandatory notification in 2018. Pregnancy-associated cases accounted for 2.8% of human listeriosis and all-cause 7-day mortality was of 11.9% in nonmaternal-neonatal listeriosis. *L. monocytogenes* was isolated from 90% of raw pork and 34% of chicken products collected in supermarkets. Sublineages SL87, SL5, and SL378 accounted for the majority (65%) of clinical cases. SL87 and SL378 were also predominant (57%) in food products. Five cgMLST clusters accounted for 57% clinical cases, suggesting unnoticed outbreaks spanning up to 6 years. Mandatory notification allowed identifying the magnitude of listeriosis in Taiwan. Continuous real-time genomic surveillance will allow reducing contaminating sources and disease burden.

IMPORTANCE Understanding the phylogenetic relationship between clinical and food isolates is important to identify the transmission routes of foodborne diseases. Here, we performed a nationwide study between 2014 and 2019 of both clinical and food *Listeria monocytogenes* isolates and sequenced their genomes. We show a 9-fold increase in listeriosis reporting upon implementation of mandatory notification. We found that sublineages SL87 and SL378 predominated among both clinical (50%) and food (57%) isolates, and identified five cgMLST clusters accounting for 57% of clinical cases, suggestive of potential protracted sources of contamination over up to 6 years in Taiwan. These findings highlight that mandatory declaration is critical in identifying the burden of listeriosis, and the importance of genome sequencing for a detailed characterization of the pathogenic *L. monocytogenes* genotypes circulating in Asia.

## **6.1.2. Etudes cliniques**

### ***Listeria*-associated lymphadenitis: A series of 11 consecutive cases and review of the literature**

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

Article: Blot M, Disson O, [Leclercq A](#), [Moura A](#), [Bracq-Dieye H](#), [Thouvenot P](#), [Valès G](#), [Burrioni B](#), [Lupo A](#), [Lecuit M](#), [Charlier C](#). *Listeria*-Associated Lymphadenitis: A Series of 11 Consecutive Cases and Review of the Literature. *Open Forum Infect Dis.* 2022 Jan 10;9(1):ofab598. doi: 10.1093/ofid/ofab598.

Abstract: We studied 11 cases of culture-proven *Listeria*-associated lymphadenitis reported to the French National Reference Center for *Listeria* from 1994 to 2019 and 8 additional published cases. *Listeria*-associated lymphadenitis is rare, but it is associated with a mortality as high as for invasive listeriosis, and it is frequently diagnosed with concomitant neoplasia.

### **Neonatal listeriosis presentation and outcome: A prospective study of 189 cases**

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

Article: Charlier C, Kermorvant-Duchemin E, Perrodeau E, Moura A, Maury MM, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Valès G, Leclercq A, Ravaut P, Lecuit M. Neonatal Listeriosis Presentation and Outcome: A Prospective Study of 189 Cases. *Clin Infect Dis.* 2022 Jan 7;74(1):8-16. doi: 10.1093/cid/ciab337.

Abstract:

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

**Methods:** We studied all neonates born alive from mothers with microbiologically proven maternal-neonatal listeriosis enrolled from November 2009 to December 2017. We analyzed presentation, neonatal outcome at discharge, and predictors of severe presentation and outcome.

**Results:** We studied 189 infants; 133 of 189 (70%) had abnormal clinical status at birth, including acute respiratory distress in 106 of 189 (56%). There were 132 of 189 (70%) infants who developed early-onset listeriosis and 12 of 189 (6%) who developed late-onset listeriosis; all presented with acute meningitis. There were 17 of 189 (9%) infants who had major adverse outcomes: 3% (5 of 189) death; 6% (12 of 189), severe brain injury; and 2% (3 of 189), severe bronchopulmonary dysplasia. Fifteen of 17 infants were born <34 weeks of gestation ( $P < .0001$  vs infants born  $\geq 34$  weeks of gestation). Maternal antimicrobial treatment  $\geq 1$  day before delivery was associated with a significant decrease in presentation severity for the infant, resulting in significantly fewer inotropic drugs, fluid resuscitation, and mechanical ventilation requirement (odds ratio, 0.23; 95% confidence interval, 0.09-0.51;  $P < .0001$ ).

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

**Clinical trials registration:** NCT01520597.

## **6.1.3. Etudes de la virulence**

### **Bacterial inhibition of Fas-mediated killing promotes neuroinvasion and persistence**

Article: Maudet C, Kheloufi M, Levallois S, Gaillard J, Huang L, Gaultier C, Tsai YH, Disson O, Lecuit M. Bacterial inhibition of Fas-mediated killing promotes neuroinvasion and persistence. *Nature.* 2022 Mar; 603(7903):900-906. doi: 10.1038/s41586-022-04505-7.

Abstract: Infections of the central nervous system are among the most serious infections, but the mechanisms by which pathogens access the brain remain poorly understood. The model microorganism *Listeria monocytogenes* (*Lm*) is a major foodborne pathogen that causes neurolisteriosis, one of the deadliest infections of the central nervous system. Although immunosuppression is a well-established host risk factor for neurolisteriosis, little is known about the bacterial factors that underlie the neuroinvasion of *Lm*. Here we develop a clinically relevant experimental model of neurolisteriosis, using hypervirulent neuroinvasive strains<sup>6</sup> inoculated in a humanized mouse model of infection, and we show that the bacterial surface protein InlB protects infected monocytes from Fas-mediated cell death by CD8<sup>+</sup> T cells in a manner that depends on c-Met, PI3 kinase and FLIP. This blockade of specific anti-*Lm* cellular immune killing lengthens the lifespan of infected monocytes, and thereby favours the transfer of *Lm* from infected monocytes to the brain. The intracellular niche that is created by InlB-mediated cell-autonomous immune resistance also promotes *Lm* faecal shedding, which accounts for the selection of InlB as a core virulence gene of *Lm*. We have uncovered a specific mechanism by which a bacterial pathogen confers an increased lifespan to the cells it infects by rendering them resistant to cell-mediated immunity. This promotes the persistence of *Lm* within the host, its dissemination to the central nervous system and its transmission.

## 6.1.4. Taxonomie

### *Listeria ilorinensis* sp. nov., isolated from cow milk cheese in Nigeria

En collaboration avec Ibrahim Adisa Raufu, Department of Veterinary Microbiology, University of Ilorin, Ilorin, Nigeria

Article publié: Raufu IA, Moura A, Vales G, Ahmed OA, Aremu A, Thouvenot P, Tessaud-Rita N, Bracq-Dieye H, Krishnamurthy R, Leclercq A, Lecuit M. *Listeria ilorinensis* sp. nov., isolated from cow milk cheese in Nigeria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2022 Jun; 72(6). doi: 10.1099/ijsem.0.005437.

Abstract: During microbial assessment of cow milk cheese products in the city of Ilorin, Nigeria, a *Listeria*-like isolate was detected that could not be assigned to any known species. Whole-genome sequence analyses against all currently known 26 *Listeria* species confirmed that this isolate constitutes a new taxon within the genus *Listeria*, with highest similarity to *Listeria costaricensis* (average nucleotide identity blast of 82.66%, in silico DNA-DNA hybridization of 28.3%). Phenotypically, it differs from *L. costaricensis* by the inability to ferment sucrose, l-fucose and starch. The absence of haemolysis and *Listeria* pathogenic islands suggest that this novel species is not pathogenic for humans and animals. The name *Listeria ilorinensis* sp. nov. is proposed, with the type strain CLIP 2019/01311T (=CIP 111875T=DSM 111566T).

## 6.1.6. Etude de la résistance aux antibiotiques et tolérance aux biocides

Dans le cadre de la surveillance épidémiologique de la résistance aux antibiotiques, le CNRL étudie l'apport de la génomique en complément de l'analyse de l'antibiogramme. Sur 22 antibiotiques investigués et selon les données d'antibiogrammes, seulement 3 peuvent être estimés en termes de résistance avec une approche de génomique. Le CNRL valide dans les outils de sa plateforme BIGSdb-*Listeria* une recherche des gènes responsables du mécanisme de tolérance de *L. monocytogenes* au chlorure de benzalkonium.

### *Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes in France*

Article soumis: Moura A, Leclercq A, Valès G, Tessaud-Rita N, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Madec Y, Charlier C and Lecuit, M. *Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance of Listeria monocytogenes in France*. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4401708> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4401708>

**Objective:** To evaluate the presence and trends of antibiotic resistance patterns of *Listeria monocytogenes* (*Lm*) isolates collected prospectively in France.

**Methods:** 2,908 clinical and 2,431 food non-redundant isolates collected in France including overseas territories between 2012 and 2019 and between 2015 and 2019, respectively, were analyzed. Antimicrobial susceptibility towards 22 antibiotics was determined for clinical isolates, and in food isolates with acquired resistance genes. Whole genome sequencing was performed, and antimicrobial resistance profiles were inferred from draft assemblies for all isolates. Concordance between phenotypic and genotypic data was evaluated.

**Results:** All tested isolates were resistant to at least 3 different classes of antibiotics, consistent with *Lm* intrinsic traits (*fosX*, *lin*, *norB*, *sul*, *pbp* genes). The acquisition of resistance genes was rare (1.03% in clinical and 3.74% in food isolates) and antimicrobial resistance phenotypes could be predicted from genome sequences with a concordance of 99.97%. Acquired resistance phenotypes were observed for tetracyclines (mostly *tetM*), trimethoprim (*dfrD*), lincosamides (*InuG*), macrolides (*ermB*, *mphB*) and phenicols (*fexA*). No isolate exhibits any resistant phenotype towards aminoglycosides or penicillins. Variations in inhibition diameters along the years were not statistically significant.

**Conclusions:** Acquired resistance in *Lm* is rare and can be inferred from genomic data with high accuracy (99.97%). Acquired resistance is more prevalent and diverse in food isolates. Reference treatment (penicillin A/aminoglycoside) remains adequate with no acquired resistance identified. Continuous antimicrobial resistance surveillance of clinical and food isolates is warranted to detect the emergence of novel resistance to antimicrobials.

## 6.1.6. Participation à la maîtrise agroalimentaire

*Assessment of the relationship between the MLST genetic diversity of Listeria monocytogenes and growth under selective and non-selective conditions*

*En collaboration avec G. Besse, ANSES-Laboratoire de Sécurité des Aliments*

Article publié: Rodrigues de Souza CR, Bergis H, Ng P, Guillier L, Félix B, Leclercq A, Gnanou Besse N. Assessment of the relationship between the MLST genetic diversity of *Listeria monocytogenes* and growth under selective and non-selective conditions. *Food Microbiology*, 114: 104303, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104303>.

Abstract: *Listeria monocytogenes* can grow under stressful conditions and contaminate various food categories. Progresss in DNA sequencing-based identification methods, such as multi-locus sequence typing (MLST) now allow for more accurate characterization of pathogens. *L. monocytogenes* MLST genetic diversity is reflected by the different prevalence of the “clonal complexes” (CCs) in foods or infections. Better understanding of the growth potentials of *L. monocytogenes* is essential for quantitative risk assessment and efficient detection across CCs genetic diversity. Using optical density measurements taken with an automated spectrophotometer, we compared the maximal growth rate and lag phase of 39 strains from 13 different CCs and various food origins, in 3 broths mimicking stressful food conditions (8 °C, aw 0.95 and pH5) and in ISO Standard enrichment broths (Half Fraser and Fraser). This is important as growth could influence risk through pathogen multiplication in food. Besides, enrichment problems could lead to a lack of detection of some CCs. Despite small differences highlighting natural intraspecific variability, our results show that growth performances of *L. monocytogenes* strains under the conditions tested in selective and non-selective broth do not appear to be strongly correlated to CCs and cannot explain higher CC “virulence” or prevalence.

## 6.2 Liste des publications et communications

Toutes publications émanant du CNR Listeria font mention du financement par Santé Publique France. En 2022, le CNR Listeria a publié 10 publications internationales.

### Publications nationales

Leclercq A, Le Monnier A Chapitre 64 : *Listeria monocytogenes*. Référentiel en Microbiologie Médicale (Remic) 2022, Société Française de Microbiologie.

### Publications internationales

Moura A, Leclercq A, Valès G, Tessaud-Rita N, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Madec Y, Charlier C, Lecuit M (2023) Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* in France. (preprint) <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4401708>.

Palacios-Gorba C, Moura A, Markovich Y, Tessaud-Rita N, Gómez-Martín Á, Bracq-Dieye H, Gomis J, Vales G, Pastor-Martín M, Thouvenot P, Escrig C, Leclercq A, Lecuit M, Querada JJ. Genomic characterization of *Listeria* spp. isolated from tonsils, udder and feces of domestic dairy ruminants in Spain. *Microbes Infect.* 2023 May; 25(4):105079.

Maudet C, Kheloufi M, Levallois S, Gaillard J, Huang L, Gaultier C, Tsai YH, Disson O, Lecuit M. Bacterial inhibition of Fas-mediated killing promotes neuroinvasion and persistence. *Nature.* 2022 Mar; 603(7903):900-906. doi: 10.1038/s41586-022-04505-7.

Tsai YH, Moura A, Gu ZQ, Chang JH, Liao YS, Teng RH, Tseng KY, Chang DL, Liu WR, Huang YT, Leclercq A, Lo HJ, Lecuit M, Chiou CS. Genomic Surveillance of *Listeria monocytogenes* in Taiwan, 2014 to 2019. *Microbiol Spectr.* 2022 Dec 21; 10(6):e0182522.

Raufu IA, Moura A, Vales G, Ahmed OA, Aremu A, Thouvenot P, Tessaud-Rita N, Bracq-Dieye H, Krishnamurthy R, Leclercq A, Lecuit M. *Listeria ilorinensis* sp. nov., isolated from cow milk cheese in Nigeria. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2022 Jun; 72(6).

Akroum S, Tubiana S, de Broucker T, Dournon N, Varon E, Ploy MC, Mourvillier B, Oziol E, Lacassin F, Laurichesse H, Hoen B, Duval X, Burdet C; and the COMBAT study group. Long-term neuro-functional disability in adult patients with community-acquired bacterial meningitis. *Infection*. 2022 Oct; 50(5):1363-1372.

Duval X, Taha MK, Lamaury I, Escaut L, Gueit I, Manchon P, Tubiana S, Hoen B; COMBAT study group. One-Year Sequelae and Quality of Life in Adults with Meningococcal Meningitis: Lessons from the COMBAT Multicentre Prospective Study.

*Adv Ther*. 2022 Jun; 39(6):3031-3041.

Palma F, Mangone I, Janowicz A, Moura A, Chiaverini A, Torresi M, Garofolo G, Criscuolo A, Brisse S, Di Pasquale A, Cammà C, Radomski N. In vitro and in silico parameters for precise cgMLST typing of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics*. 2022 Mar 26; 23(1):235.

El Zowalaty ME, Moura A, Lecuit M, Zishiri OT. Draft Genome Sequence of *Listeria innocua* Strain MEZLIS29, Isolated from a Cow in South Africa. *Microbiol Resour Announc*. 2022 Mar 17; 11(3):e0112221. .

Blot M, Disson O, Leclercq A, Moura A, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Valès G, Burrioni B, Lupo A, Lecuit M, Charlier C. *Listeria*-Associated Lymphadenitis: A Series of 11 Consecutive Cases and Review of the Literature. *Open Forum Infect Dis*. 2022 Jan 10; 9(1):ofab598.

Charlier C, Kermorvant-Duchemin E, Perrodeau E, Moura A, Maury MM, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Leclercq A, Ravaud P, Lecuit M. Neonatal listeriosis presentation and outcome: a prospective study of 189 cases. *Clin Infect Dis*. 2022 Jan 7; 74(1):8-16.

## Communications nationales

Surveillance génomique des *Listeria monocytogenes* d'origine alimentaire - Bilan des contrôles officiels 2019-2021, Rencontres Nationales de Santé Publique Vétérinaire (ADILVA), Bourges, France, (2022) Octobre 13-14, Claire Yvon (Anses, Laboratoire de sécurité des Aliments, Maisons-Alfort)

The gut microbiota and infections. Microbiota day, Institut Pasteur, Paris, France, (2022) Jun 27, M. Lecuit

Infections intra-utérines Journées de Port Royal. Port Royal, Paris, France, (2022), C. Charlier

Le futur de l'Obstétrique vu par l'infectiologue Assises Amazoniennes obstétrique. Cayenne, Guyane, France, (2022), C. Charlier

Infections virales /grossesses. Infections materno fœtales. Journée Infectiologie Littoral Breton, Vannes, France, (2022) C. Charlier

## Communications internationales

Working with International Organization: A testimony. WISE Special Lectures, Hokkaido University, Japan, (2022) February 2, WHO Webinaire, Alexandre Leclercq

BIGSdb-*Listeria*: from strain nomenclature to global pathogen surveillance, ESCMID, 13<sup>th</sup> International meeting on microbial epidemiological markers (IMMEM XIII), Bath, United Kingdom, (2022) September 14, Poster P2-60 [A. Moura](#), F. Palma, B. Brancotte, B. Raffestin, Y. Ghorbal, K. Jolley, S. Brisse, [M. Lecuit](#)

Bacterial inhibition of Fas-mediated killing promotes neuroinvasion and persistence. ASM Microbe 2022, Washington, DC, USA, (2022), Jun 9-13

How and why *Listeria* breaches host barriers. 19th International Congress of Developmental Biology, Salgados Palace, Algarve, Portugal, (2022), Oct 16-20

### Conférences sur invitations

Presentation of Institut Pasteur. The next generation in infection biology. EMBL Heidelberg, (2022) Jan 26-27

Neuroinfection: clinical presentation and pathophysiology. Masterclass in CNS infections, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark, (2022), Jun 01 [virtual]

The WHO Collaborating Centre *Listeria*. Technical briefing on *Listeria* and *Salmonella* - Introducing WHO Collaborating Centres' work at Institut Pasteur, WHO headquarters, Geneva, Switzerland, (2022), Jun 15 [virtual]

Outsmarting the host: *Listeria* interplay with host cells and tissues. The last words belong to microbes. Pasteur Jubilee Conference, Warsaw, Poland (2022), Nov 29-30

### Membres de comité d'organisation ou modérateur de congrès

Caroline Charlier, Marc Lecuit membres du comité de programme de la RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), Paris, France (2022) Décembre

Caroline Charlier, membre du conseil d'administration de la RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse) et modération de 3 sessions congrès RICAI 2022

## 7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

---

Une base privée LNRL des souches de PS/PC a été créée dans la plateforme BIGSdb-*Listeria* permettant de communiquer rapidement toutes séquences pour la surveillance nationale. En 2022, 273 séquences ont été versées à la surveillance.

### *Echanges entre le CNR et le LNR*

En 2022, le CNRL a communiqué des séquences génomiques au LNRL dans le cadre de la surveillance européenne et a reçu 1 souche ainsi que 22 séquences du LNRL notamment celles isolées dans les plans de surveillance et de contrôle des aliments de la DGAL en 2022.

## 8. Programme d'activité pour les années suivantes

---

Le CNRL assurera les activités de surveillance de la listériose dans le cadre du cahier des charges publié par SpF et de l'application des procédures régissant le fonctionnement de la Cellule *Listeria*.

Le programme de travail du CNRL pour les années 2022-2023 comportera les aspects suivants:

### **Surveillance microbiologique :**

- Améliorer la rapidité de la typage moléculaire des souches, avec la séquençage en temps réel (Oxford Nanopore Technologies) ;
- Détection de la résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques, détermination des mécanismes de résistance et tolérance ;
- Caractérisation du contexte génétique des traits de résistance (phages, plasmides, séquences d'insertion, transposons, ...);
- Etude de la saisonnalité de la listériose;
- Analyse des souches atypiques de *Listeria*;
- Etude de la dynamique des clones au sein des souches réceptionnées dans le cadre de la surveillance;
- Détection de la persistance de clones dans les environnements de production agroalimentaires ;
- Investigation des clusters de souches alimentaires/environnementales ou humaines ;
- Détermination de la nature des souches du portage de *Lm*;

### **Aspects diagnostiques :**

- Évaluation de la virulence des souches de *Lm*, et mise en évidence des caractéristiques génotypiques et phénotypiques permettant de stratifier la virulence.

### **Aspects thérapeutiques :**

- Évaluation de l'antibiorésistance de *Lm* et de ses mécanismes;
- Évaluation d'alternatives thérapeutiques dans le traitement de la listériose;
- Essai thérapeutique simulé évaluant le traitement des neurolistérioses ;

### **Aspects cliniques :**

- Etudes des ascites à *Listeria*, dernière forme « rare » non explorée ; en cours
- Listériose pédiatrique ; en cours
- Etude de la listériose chez les femmes enceintes de la cohorte Monalisa (période 2009-2020) ; en cours
- Etude des neurolistérioses de la cohorte Monalisa (période 2009-2020) ; en cours

### **Aspects préventifs :**

- Participation à l'élaboration de recommandations ciblées pour les différentes populations à risque.

### **Contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux :**

- Participation à l'analyse des clusters rapportés à l'ECDC ou l'OMS ;
- Contribution avec SpF au reporting des données françaises à l'ECDC.
- Collaboration avec les réseaux internationaux pour la validation des différents pipelines d'assemblage et typage de génomes

## 9. Références

1. Cobo F, Borrego J, Rodriguez-Granger J, Puertas A, Sampedro A, Navarro-Mari JM. 2019. Detection of bacterial pathogens in sterile fluids with the FilmArray Meningitis/Encephalitis identification system. *Rev Esp Quimioter* 32:85-86.
2. Graf EH, Farquharson MV, Cardenas AM. 2017. Comparative evaluation of the FilmArray meningitis/encephalitis molecular panel in a pediatric population. *Diagn Microbiol Infect Dis* 87:92-94.
3. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat JM, Cullison J, Daly J, Holt S, Lephart P, Salimnia H, Schreckenberger PC, DesJarlais S, Reed SL, Chapin KC, LeBlanc L, Johnson JK, Soliven NL, Carroll KC, Miller JA, Dien Bard J, Mestas J, Bankowski M, Enomoto T, Hemmert AC, Bourzac KM. 2016. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol* 54:2251-61.
4. Soucek DK, Dumkow LE, VanLangen KM, Jameson AP. 2019. Cost Justification of the BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel Versus Standard of Care for Diagnosing Meningitis in a Community Hospital. *J Pharm Pract* 32:36-40.
5. von Allmen N, Endelmann A, Kuehn S. 2016. Performance comparison of the new filmarray meningitis/encephalitis panel with routine diagnostic methods. *J Clin Virol* 82:S33.
6. Bastin B, Bird P, Crowley E, Benzinger MJ, Agin J, Goins D, Sohler D, Timke M, Awad M, Kostrzewa M. 2018. Confirmation and Identification of *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp. and Other Gram-Positive Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study, First Action 2017.10. *J AOAC Int* 101:1610-1622.
7. Thouvenot P, Vales G, Bracq-Dieye H, Tessaud-Rita N, Maury MM, Moura A, Lecuit M, Leclercq A. 2018. MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of *Listeria* species in surveillance: A prospective study. *J Microbiol Methods* 144:29-32.
8. Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, Hamelin E, Laurent E, Fredriksen N, Van Cauteren D, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Tessaud-Rita N, Maury MM, Alexandru A, Criscuolo A, Quevillon E, Donguy MP, Enouf V, de Valk H, Brisse S, Lecuit M. 2017. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerg Infect Dis* 23:1462-1470.
9. De Valk H, Tourdjman M, Leclercq A, Maury MM, Moura A, Chenal-Francisque V, Goulet V, Brisse S, Lecuit M. 2016. Changes in epidemiology and surveillance of listeriosis in France, abstr ISOPOL XIX, Paris, France, 14-17 June 2016.
10. Palacios-Gorba C, Moura A, Gomis J, Leclercq A, Gomez-Martin A, Bracq-Dieye H, Moce ML, Tessaud-Rita N, Jimenez-Trigos E, Vales G, Garcia-Munoz A, Thouvenot P, Garcia-Rosello E, Lecuit M, Quereda JJ. 2021. Ruminant-associated *Listeria monocytogenes* isolates belong preferentially to dairy-associated hypervirulent clones: a longitudinal study in 19 farms. *Environ Microbiol* 23:7617-7631.
11. Charlier C, Fevre C, Travier L, Cazenave B, Bracq-Dieye H, Podevin J, Assomany D, Guilbert L, Bossard C, Carpentier F, Cales V, Leclercq A, Lecuit M. 2014. *Listeria monocytogenes*-associated biliary tract infections: a study of 12 consecutive cases and review. *Medicine (Baltimore)* 93:e105.
12. Charlier C, Leclercq A, Cazenave B, Desplaces N, Travier L, Cantinelli T, Lortholary O, Goulet V, Le Monnier A, Lecuit M. 2013. *Listeria monocytogenes*-associated joint and bone infections: a study of 43 consecutive cases. *Clin Infect Dis* 54:240-8.
13. Charlier C, Poirée S, Delavaud C, Khoury G, Richaud C, Leclercq A, Hélénon O, Lecuit M. 2018. Imaging of human neuroinfectious: a prospective study of 71 cases. *Clin Infect Dis In Press*.
14. Chersich MF, Takkinen J, Charlier C, Leclercq A, Adams PE, Godbole G, Altmeyer U, Friesema IHM, Labbe Sandelin L, Jenkin L, Fontana L, Aldigeri R, Venter F, Luchters SMF, Lecuit M, Cimino L. 2017. Diagnosis and Treatment of *Listeria monocytogenes* Endophthalmitis: A Systematic Review. *Ocul Immunol Inflamm* doi:10.1080/09273948.2016.1276788:1-10.
15. Danion F, Maury MM, Leclercq A, Moura A, Perronne V, Leotard S, Dary M, Tanguy B, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Lecuit M, Charlier C. 2017. *Listeria monocytogenes* isolation from urine: a series of 15 cases and review. *Clin Microbiol Infect* 23:583-585.
16. Morgand M, Leclercq A, Maury MM, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Lecuit M, Charlier C. 2018. *Listeria monocytogenes*-associated respiratory infections: a study of 38 consecutive cases. *Clin Microbiol Infect* 24:1339 e1-1339 e5.
17. Pilmis B, Leclercq A, Maury MM, Moura A, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Lecuit M, Charlier C, cutaneous listeriosis study g. 2020. Cutaneous listeriosis, a case series of 16 consecutive patients over 25 years. *J Infect* 80:232-254.
18. Shoai-Tehrani M, Pilmis B, Maury MM, Robineau O, Disson O, Jouvion G, Couplier G, Thouvenot P, Bracq-Dieye H, Vales G, Leclercq A, Lecuit M, Charlier C, *Listeria* endovascular infections study g. 2019. *Listeria monocytogenes*-associated endovascular infections: A study of 71 consecutive cases. *J Infect* 79:322-331.
19. Hof H, Nichterlein T, Kretschmar M. 1997. Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 10:345-57.
20. Pouillot R, Hoelzer K, Jackson KA, Henao OL, Silk BJ. 2012. Relative risk of listeriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites according to age, pregnancy, and ethnicity. *Clin Infect Dis* 54 Suppl 5:S405-10.

21. Disson O, Grayo S, Huillet E, Nikitas G, Langa-Vives F, Dussurget O, Ragon M, Le Monnier A, Babinet C, Cossart P, Lecuit M. 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* 455:1114-8.
22. Jacquet C, Doumith M, Gordon JI, Martin PM, Cossart P, Lecuit M. 2004. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis* 189:2094-100.
23. Maury MM, Tsai YH, Charlier C, Touchon M, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Criscuolo A, Gaultier C, Roussel S, Brisabois A, Disson O, Rocha EP, Brisse S, Lecuit M. 2016. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet* 48:308-13.
24. Maury MM, Bracq-Dieye H, Huang L, Vales G, Lavina M, Thouvenot P, Disson O, Leclercq A, Brisse S, Lecuit M. 2019. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat Commun* 10:2488.
25. Angelidis AS, Kalamaki MS, Georgiadou SS. 2015. Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a beta-D-glucosidase-positive phenotype on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA). *Int J Food Microbiol* 193:114-29.
26. Cotter PD, Draper LA, Lawton EM, Daly KM, Groeger DS, Casey PG, Ross RP, Hill C. 2008. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 4:e1000144.
27. Lecuit M, Nelson DM, Smith SD, Khun H, Huerre M, Vacher-Lavenu MC, Gordon JI, Cossart P. 2004. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6152-7.
28. Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, Babinet C, Cossart P. 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722-5.
29. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Herve-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, Courvalin P, Le Monnier A. 2010. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2728-31.
30. FAO, OMS. 2002. Exemple de la cellule "Listeria", abstr Conférence paneuropéenne sur la sécurité sanitaire et la qualité des aliments, document de séance de la délégation française, Budapest, Hongrie,
31. Roussel S., Leclercq A, Santolini A, Agbessi A, Chenal-Francisque, V. L, R. L, M., , Pihier N, Brisabois A. 2012. Surveillance des *Listeria monocytogenes* dans les aliments. . *Bull Epidemiol Bebdom Hors série*. 9 mai 2012:41-45.
32. Anonyme. 2002. Règlement (CE) No 178/2002 du parlement européen et du conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes*:1-24.
33. Anonyme. 2007. Règlement (CE) no 1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) no 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes* 0012 - 0029.
34. de Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, Havelaar A, Speybroeck N. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 14:1073-82.
35. Leclercq A, Charlier C, Lecuit M. Global burden of listeriosis: the tip of the iceberg. *Lancet Infect Dis* 14:1027-8.
36. Lazarus C, Leclercq A, Lecuit M, Vaillant V, Coignard B, Blanchard H, Novakova I, Astagneau P. 2013. Probable nosocomial transmission of listeriosis in neonates. *J Hosp Infect* 85:159-60.
37. Tourdjman M, Leclercq A, Groleau C, Soyler L, Moura A, Laurent E, Donguy MP, Conan G, Legoff D, Brisse S, Lecuit M, De Valk H. 2016. Hospital-Acquired listeriosis outbreak linked to prolonged contamination of a hospital kitchen environment - France, 2013, abstr International Symposium on Problems of Listeriosis (ISOPOL) XIX, Paris, France,
38. Moura A, Criscuolo A, Pouseele H, Maury MM, Leclercq A, Tarr C, Bjorkman JT, Dallman T, Reimer A, Enouf V, Larssonneur E, Carleton H, Bracq-Dieye H, Katz LS, Jones L, Touchon M, Tourdjman M, Walker M, Stroika S, Cantinelli T, Chenal-Francisque V, Kucerova Z, Rocha EP, Nadon C, Grant K, Nielsen EM, Pot B, Gerner-Smidt P, Lecuit M, Brisse S. 2016. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat Microbiol* 2:16185.
39. Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, Hamelin E, Laurent E, Fredriksen N, Van Cauteren D, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, Tessaud-Rita N, Maury MM, Alexandru A, Criscuolo A, Quevillon E, Donguy MP, Enouf V, de Valk H, Brisse S, Lecuit M. 2017. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerg Infect Dis* 23:1462-1470.
40. Richard S, Oggioni C, Jacquet C, Laurent E, Lequerrec F, Quelquejeu N, Goulet V. 2004. Investigations autour de cas de listériose neuroméningée: bilan de 1è mois de fonctionnement. *Bull Epidemiol Hebdom* 9:35-36.
41. Haase JK, Didelot X, Lecuit M, Korkeala H, Achtman M. 2013. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale Multilocus Sequence Typing study. *Environ Microbiol* 16:405-16.
42. Haase JK, Murphy RA, Choudhury KR, Achtman M. Revival of Seeliger's historical 'Special *Listeria* Culture Collection'. *Environ Microbiol* 13:3163-71.
43. Leclercq A, Le Monnier A. 2022. *Listeria monocytogenes*, p 569-574. In *Microbiologie SFD (ed), Référentiel en microbiologie médicale (REMIC)*, 7 ed, vol 6.2, Paris, France.
44. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42:3819-22.
45. 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.

46. *Chenal-Francisque V, Charlier C, Mehvish S, Dieye H, Leclercq A, Courvalin P, Lecuit M. Highly Rifampin-Resistant Listeria monocytogenes Isolated from a Patient with Prosthetic Bone Infection. Antimicrob Agents Chemother 58:1829-30.*
47. *Chenal-Francisque V, Maury MM, Lavina M, Touchon M, Leclercq A, Lecuit M, Brisse S. 2015. Clonogrouping, a Rapid Multiplex PCR Method for Identification of Major Clones of Listeria monocytogenes. J Clin Microbiol 53:3355-8.*
48. *Anonyme. 2020. Comité de l'Antibiogramme de la SFM (CASFM) V1.0 Octobre 2022, 1st ed. SFM & EUCAST, Paris, France.*
49. *Gholizadeh Y, Poyart C, Juvin M, Beretti JL, Croize J, Berche P, Gaillard JL. 1996. Serodiagnosis of listeriosis based upon detection of antibodies against recombinant truncated forms of listeriolysin O. J Clin Microbiol 34:1391-5.*
50. *Dack K, Pankow S, Ablah E, Zackula R, Assi M. 2019. Contribution of the BioFire((R)) FilmArray((R)) Meningitis/Encephalitis Panel: Assessing Antimicrobial Duration and Length of Stay. Kans J Med 12:1-3.*
51. *Leitner E, Hoenigl M, Wagner B, Krause R, Feierl G, Grisold AJ. 2016. Performance of the FilmArray Blood culture identification panel in positive blood culture bottles and cerebrospinal fluid for the diagnosis of sepsis and meningitis. GMS Infect Dis 4:Doc06.*
52. *Wootton SH, Aguilera E, Salazar L, Hemmert AC, Hasbun R. 2016. Enhancing pathogen identification in patients with meningitis and a negative Gram stain using the BioFire FilmArray((R)) Meningitis/Encephalitis panel. Ann Clin Microbiol Antimicrob 15:26.*
53. *De Lappe N, Lee C, O'Connor J, Cormican M. 2014. Misidentification of Listeria monocytogenes by the Vitek 2 system. J Clin Microbiol 52:3494-5.*

# 1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

---

## 1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

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

Le CNRL est en contact avec plus de 300 biologistes français, ainsi que les laboratoires vétérinaires départementaux, la DGCCRF et les laboratoires privés d'hygiène des aliments (environ 172 correspondants). Il est membre du réseau R2M des Biologistes médicaux français et en contact avec l'ensemble des laboratoires du contrôle officiel par l'ADILVA (Association Française des Directeurs et cadres de Laboratoires Vétérinaires Publics d'Analyses) et le LNRL ainsi que les laboratoires SCL de la DGCCRF.

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

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

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

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

### 1. Expertise

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

### 2. Conseil

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

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

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

4. Contribution à l'alerte

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

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

## 1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

Tableau 9. Personnel affecté au CNR *Listeria*

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

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

\*\* Personnel non financé par SpF.

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

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

## 1.3 Locaux et équipements

### 1.3.1. Locaux

#### Laboratoires et bureaux :

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

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

- 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.

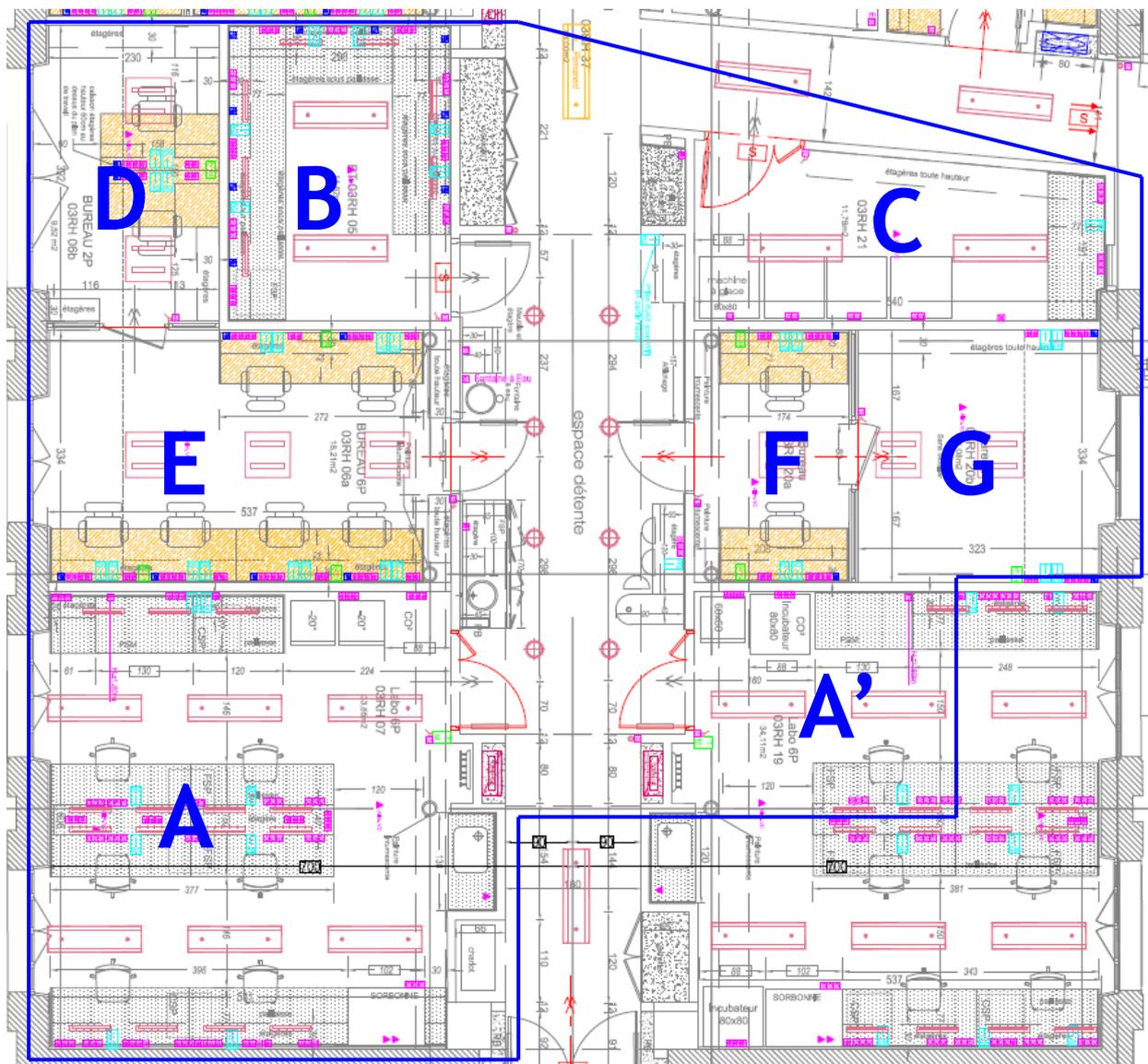


Figure 21. Plan des locaux du CNR *Listeria*. Les Lettres bleues sont définies ci-dessous

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

### **1.3.1. 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.

L'Institut Pasteur a financé l'acquisition d'équipements en 2022 d'un nouveau thermocycleur (BioRad T100) pour ces essais de PCR dans le cadre du cahier des charges SpF du CNR, du management de la qualité du CNRL et du respect des réglementations.

#### **Matériel, équipements utilisés**

- Matériel courant d'un laboratoire réglementaire de confinement L2 de microbiologie classique et de biologie moléculaire,
- 2 postes de sécurité microbiologique PSM II,
- 1 hotte à flux laminaire pour la préparation des mélanges réactionnels PCR,
- 2 étuves,
- 3 bains thermostatés humides et 1 bain thermostaté à sec,
- 5 réfrigérateurs,
- 3 congélateurs,
- 2 congélateurs -80°C,
- 3 centrifugeuses dont une pour les plaques,
- 3 thermocycleurs en point final (Pouvant être partagés dans le cadre du mode dégradé du LREMS),
- 2 générateurs et cuves d'électrophorèse,
- 2 néphélomètres
- 1 séquenceur long-reads (MinION Mk1C, Oxford Nanopore Technologies)
- 1 fax et 1 copieur conformes à la réglementation sur les données de santé.

#### **Equipements partagés**

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

#### **Equipement informatique**

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

#### **Moyens extérieurs à la structure / Structures transversales**

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

## 1.4 Collections de matériel biologique

### Les différentes collections de souches bactériennes

Il existe 8 catégories de souches envoyées au CNRL :

1. **souches humaines** : souches ayant été à l'origine de cas cliniques.
2. **alerte sanitaire** : souches d'origine alimentaire ou issues de l'environnement de production de ces aliments, isolées dans le cadre d'investigation de cas groupés ou d'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.

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

En 2022, le CNRL n'a pas reçu de demandes de distribution de sérums et n'a pas communiqué de souches d'alertes produits au LNRL. Le CNRL échange maintenant les séquences génomiques qu'ils possèdent comme lors des investigations d'épidémies comme décrit précédemment.

Par contre, il a distribué, sous MTA, 55 souches représentant les principaux sérotypes de *Listeria monocytogenes* au Pr. Felix Randow, MRC laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Angleterre dans le cadre d'une étude.

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

Le CNRL dispose des souches types complètement caractérisées des 28 espèces et 8 sous-espèces du genre *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* subsp. *grayi*, *L. grayi* subsp. *murrayi*, *L. rocourtiae*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii*, *L. fleischmannii* subsp. *colorendiensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, *L. newyorkensis*, *L. costaricensis*, *L. goaensis*, *L. thailandensis*, *L. farberii*, *L. portnoyi*, *L. rustica*, *L. immobilis*, *L. cossartiae* subsp. *cauygensis*, *L. cossartiae* subsp. *cossartiae*, *L. valentina*, *L. ilorinensis*, *L. swaminathanii*), ainsi que des 15 souches de référence pour la sérotypie. Le CNR actualise sa collection avec les nouvelles espèces ou souches atypiques. Toutes ces souches sont conservées en géloses profondes dans des pièces à température contrôlée, et à -80°C en tubes de cryo-billes dans deux congélateurs sous alarme.

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

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

Cette collection, majoritairement française, mais également internationale (CCOMS) comportait 121.073 souches à la fin de l'année 2022. 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 74.320 souches de cette collection proviennent du CNRL. Elles sont conservées en géloses profondes dans une pièce à température contrôlée. Les souches d'origine humaine et, depuis janvier 2017, les souches alimentaires et de l'environnement sont conservées à -80°C en tubes de cryobilles dans deux congélateurs sous alarme. Le CNRL conserve également des souches isolées entre 1987 et 1992 provenant de la collection du CNRL alors hébergé au CHU de Nantes.

### **Special *Listeria* Culture Collection (SLCC)**

Il s'agit de la collection de *Listeria* d'H.P.R. Seeliger (Würzburg, Allemagne) qui comporte plus de 5000 souches isolées entre 1926 et 1985. L'intérêt de cette collection léguée au CCOMS *Listeria* est de contenir des souches anciennes, isolées depuis la première souche de *L. monocytogenes* (1921), de diverses origines géographiques, mais majoritairement France et Allemagne. Une base de données regroupe l'ensemble des données sur ces souches. Certaines sont actuellement utilisées dans le cadre de projets de recherche sur l'évolution et la biodiversité de *Listeria* (41, 42). Ces souches ont été caractérisées phénotypiquement et sont conservées en gélose profonde dans des pièces à température contrôlée.

### **Collection ILSI North America**

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

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

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

### **Les bactériophages**

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

## Conditions de mise à disposition des collections

Le CNRL valorise son savoir-faire et son expertise en mettant à disposition de tiers académiques et industriels des duplicatas des souches.

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

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

Ainsi, le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures nécessite la mise en place d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA).

## 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.

## 1.5 Démarche qualité du laboratoire

Le CNRL fait partie du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS), qui est accrédité selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189, sous la section Humaine du COFRAC au numéro 8-2588. Le CNRL possède un correspondant qualité qui anime cette démarche qualité. Des documents transversaux (manuel qualité et organigramme...) ainsi que des procédures générales sont utilisés au sein du LREMS, et donc par le CNRL pour assurer un fonctionnement commun dans le cadre de cette démarche qualité. Les activités qui en relèvent sont conduites selon la norme NF EN ISO 15189.

Le CNRL a mis en place un système permettant d'effectuer des analyses en urgence et en mode dégradé si le contexte le nécessite.

### Essais d'intercomparaison (EQA)

Le CNR participe annuellement à des contrôles externes de la qualité (outre ses contrôles de première et deuxième ligne). En 2022 (2021 : absence d'EQA organisé par l'ECDC), le CNRL a réalisé un essai d'intercomparaison organisé par l'ECDC sur le sérotype PCR de *Lm* par PCR multiplexe point final ou par PCR *in silico* déduite de la séquence génomique de la souche (Tableau 10).

**Tableau 10.** Résultats du CNRL à l'EQA de l'EURL-Lm puis de l'ECDC de 2012 à 2022.

Campagne EQA (Date)		EURL Lm (Avril 2012)	EQA N°1 ECDC (Mars 2013)	EQA N°2 ECDC (Octobre 2013)	EQA N°3 ECDC (Octobre 2014)	EQA N°4 ECDC (Octobre 2015)	EQA N°1 ISP (Décembre 2016)	EQA N°1 Bruker (Septembre 2017)	EQA N°5 ECDC (Octobre 2017)	EQA N°6 ECDC (Octobre 2018)	EQA N°7 ECDC (Juillet 2019)	EQA N°8 ECDC (Juillet 2020)	EQA N°9 ECDC (Juillet 2022)
Nombre de laboratoires participants		33	18	18	18	18	2	5	18	18	18	18	18
Nombre de souches testées		10	10	10	11	11	15	36	11	11	11	11	11
Identification Lm par phénotypie		Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Identification Lm par Maldi-Tof MS		ND	ND	ND	ND	ND	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND	ND
Scores sérotypage classique		ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Scores sérotypage moléculaire - PCR multiplexe		ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Scores sérotypage moléculaire - PCR <i>in silico</i>		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Qualité Gel PFGE	<i>AscI</i>	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	<i>ApaI</i>												
Analyse gel PFGE Bionumerics		Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

## 2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

---

### 2.1 Liste des techniques de référence

Les souches font systématiquement l'objet des analyses suivantes :

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

- **Vérification** du caractère hémolytique sur gélose au sang de cheval (bioMérieux, France).

- **Identification du genre et de l'espèce par spectrométrie de masse Maldi-Tof (Bruker Daltonics, Allemagne)**, complétés par d'autres tests classiques si nécessaire (7, 43). La méthode plus précise pour l'identification des *Listeria*, surtout des souches atypiques, est le séquençage du génome. L'identification par analyse du gène codant pour la sous-unité ribosomale 16S après amplification par PCR peut-être considérer pour des *Listeria* plus fréquentes (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*) mais manque de précision pour d'autres *Listeria* spp.

- **Détermination du sérotype PCR** selon la méthode publiée par le CNRL en 2004 (44) et amendée en 2011 (45). Cette PCR multiplex cible une partie de la séquence du gène *prs* présent dans l'ensemble des espèces *Listeria* et quatre autres gènes (*Imo1118*, *Imo0737*, *ORF2110*, *ORF2819*) spécifiques de *Lm*, permettant de déterminer le sérotype PCR. Cette PCR multiplex peut être effectuée directement sur colonie sur gélose de la souche envoyée par le correspondant. Le sérotype PCR est également identifié *in silico* à partir de la séquence génomique. La comparaison du sérotype PCR déterminé *in silico* avec celui déterminé *in vitro* est utilisée comme contrôle interne pour confirmer la concordance entre la séquence génomique et l'isolat correspondant. Le CNRL possède l'ensemble des sérums antifacteurs O et H commerciaux et de référence OMS pour réaliser sur demande (majoritairement hors-France) le sérotypage classique des souches de *Listeria* spp.

- **Antibiogramme** de toutes les souches d'origine humaine en utilisant la technique de diffusion en milieu gélifié selon les recommandations de l'EUCAST. Ces antibiogrammes sont effectués sur un panel de 23 antibiotiques. La lecture de l'antibiogramme est réalisée sur un automate Scan 4000 (InterScience) paramétré pour le référentiel EUCAST. Les éventuelles résistances sont confirmées par la détermination de la CMI par E-test. Les mécanismes des résistances identifiées sont ensuite étudiés (29, 46).

- **Séquençage du génome**. Les ADNs génomiques sont extraits (méthode DNeasy Blood & Tissue extraction kit (Qiagen, Danemark)) et vérifiés en qualité par fluorimétrie. La préparation des librairies est réalisée en utilisant le kit NEXTERA XT DNA Sample et les séquences génomiques sont déterminées sur la plateforme Illumina NextSeq 500 (Illumina, Californie, USA). L'assemblage est réalisé avec le logiciel SPAdes. Le profil cgMLST est extrait du génome assemblé par l'algorithme BLASTN implémenté sur la plateforme BIGSdb-*Lm* (<http://bigsdb.pasteur.fr/Listeria/Listeria.html>) puis transféré dans le logiciel bioNumerics version 7.6. pour réaliser les comparaisons et analyses. Cette méthode cgMLST est utilisée depuis le 1er 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. Ce séquençage permet de revalider entièrement le processus analytique ci-dessous comme un contrôle qualité interne.

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

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

- **Typage MLST par PCR multiplexe**. L'appartenance à un clone MLST peut être déterminée rapidement par une méthode de PCR multiplexe (PCR de clonogrouping) développée et brevetée par le CNRL (47). Cette méthode

permet de positionner rapidement les souches par rapport aux clones MLST majeurs et d'ainsi prédire le potentiel infectieux des souches (23).

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

- À la demande de l'ANSM, le CNRL réalise également des analyses de détection de souches de *Lm* viables par isolement sur gélose ALOA (bioMérieux) à partir d'échantillons de selles. Aucune demande en 2022 sachant que le CNRL avait transmis sa méthode à l'APHP, les Hôpitaux de Marseille et Cerballiance qui peuvent eux-mêmes réaliser cette méthode.

Le CNRL ne réalise pas :

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

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

## 2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

### En microbiologie clinique

Le CNRL recommande de suivre les recommandations de l'European Manual of Clinical Microbiology / REMIC européen, 7e édition, 2022, chapitre *Listeria* (64).

Dans le cas de la réception d'un prélèvement en vue de la réalisation d'une PCR sur échantillons biologiques ou de sérologie, le CNRL transfère la demande au service accrédité COFRAC de Microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants malades pour les demandes de PCR sur LCR et aux laboratoires spécialisés (Cerballiance ou Biomnis) pour les demandes de sérologie (Les tests sérologiques ne sont pas recommandés par le référentiel en Microbiologie (REMIC) 2022 (64)).

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

Hémoculture : milieux commerciaux classiques

LCR : Bouillon nutritif glucosé à 0,5%

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

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

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

- Identification

L'identification par MalDI-ToF est correcte pour les principales espèces isolées en France pour le système MALDI-TOF MS Bruker Daltonics équipé ou non du système subtyping développé spécifiquement pour *Listeria* et est correcte pour le genre pour le MalDI-ToF MS Vitek MS (bioMérieux) (1, 68). La simple préparation directe est

suffisante, mais en cas de résultats douteux une extraction totale des protéines est conseillée.

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

- Sérotypage

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

- Antibiogramme

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

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

Le CNRL recommande l'utilisation du protocole EUCAST v12.0 (2022) dont les protocoles et interprétations sont disponibles à l'adresse web : [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/) qui est complété par les valeurs d'interprétation contenues dans le M45 (3rd édition, 2015) et le M100 (33th édition, 2023) du CLSI (70, 71). L'utilisation des PK/PD d'EUCAST pour les breakpoints non définis pour *Listeria monocytogenes* est à noter comme pour la gentamicine. Les concentrations minimales inhibitrices et les diamètres sont en cours d'établissement.

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

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

Tableau 12. Valeurs de référence pour l'interprétation des antibiogrammes pour *Listeria monocytogenes* (\* selon le CLSI M45 (3rd edition, 2015) ainsi que le CLSI M100 (32th edition, 2022) et \*\* selon l'EU-CAST version 12.0 page 84 à [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/))

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

- *Méthodes de PCR*

Il s'agit :

- des méthodes les plus utilisés d'amplification par qPCR du gène *hly* de *Listeria monocytogenes* sur LCR (commerciales ou selon la publication : *Le Monnier A, Abachin E, Beretti JL, Berche P, Kayal S. Diagnosis of Listeria monocytogenes meningoenphalitis by real-time PCR for the hly gene. J Clin Microbiol. 2011 Nov;49(11):3917-23.* ) ;
- de la méthode de PCR syndromique sur LCR avec le kit Filmarray Méningites/Encéphalites (bioMérieux, Marcy l'Etoile) (1-5, 50-52). La limite de détection (LOD) de la méthode signalée par le fabricant est de 1000 UFC/ml, mais elle peut atteindre 250 UFC/ml lors de la vérification de l'implémentation de la méthode dans le laboratoire ;
- pour les PCR syndromiques sur sang du kit Filmarray Blood Culture Identification (BCID, bioMérieux, Marcy l'Etoile) (51).

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

#### *En microbiologie vétérinaire*

Le CNRL recommande de suivre les instructions du chapitre 3.10.5. *Listeria monocytogenes* du Manuel des tests de diagnostics et des vaccins pour les animaux terrestres 2021 de l'Office International des Epizooties téléchargeables à l'adresse :

[HTTPS://WWW.WOAH.ORG/FILEADMIN/HOME/ENG/HEALTH\\_STANDARDS/TAHM/3.10.05\\_LISTERIA\\_MONO.PDF](HTTPS://WWW.WOAH.ORG/FILEADMIN/HOME/ENG/HEALTH_STANDARDS/TAHM/3.10.05_LISTERIA_MONO.PDF)

#### *En microbiologie des aliments*

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

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

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

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

<https://microval.org/>

Concernant les méthodes commerciales d'identification des *Listeria*, le CNRL recommande l'utilisation de la galerie API *LISTERIA* (bioMérieux) ainsi que le Vitek 2 (bioMérieux) (53) et comme alternative la galerie MICROBACT 12L (Oxoïd), il recommande à ses laboratoires correspondants ou interlocuteurs de se conformer aux recommandations émanant du Laboratoire National de Référence des *Listeria monocytogenes* situé à l'ANSES-LSA (Maisons-Alfort). Le système Maldi-Tof MS Bruker Daltonics avec la méthode MALDI Biotyper peut être également utilisé avec de préférence une extraction totale des protéines ou par un dépôt direct pour une identification des principales espèces de *Listeria* isolées en France (Méthode validée en 2018 Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) International : OMA#2017.10. First Action ; en 2018 par Microval Certificate N°2017LR75) (6).

### **3. Annexe 3 : Déclaration publique d'intérêts du responsable (Marc LECUIT)**

---

Disponible sur <https://dpi.sante.gouv.fr>