

Caractérisation génomique de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer : bilan des contrôles officiels 2019-2021

Claire Yvon¹, Marie Vesselle¹, Alexandre Leclercq², Vincent Leclerc¹, Delphine Fert¹,

Lena Barre¹, Corinne Danan¹

Auteur correspondant : claire.yvon@anses.fr

¹ Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Unité Salmonella et Listeria, LNR *Listeria monocytogenes*, Maisons-Alfort, France

² Institut Pasteur, Centre national de référence *Listeria*, Paris

Résumé

Listeria monocytogenes (*Lm*) est une bactérie pathogène responsable de la listériose, dont la voie de contamination est principalement alimentaire. La caractérisation des souches isolées de la chaîne agro-alimentaire contribue à mieux connaître leur écologie et à évaluer les risques sanitaires liés aux aliments. Dans cette perspective, le Laboratoire National de Référence pour *Listeria monocytogenes* (LNR) s'est engagé depuis 2019 dans la caractérisation génomique systématique des souches isolées des contrôles officiels. Cet article décrit l'organisation mise en place pour cette caractérisation et présente les résultats obtenus sur la période 2019-2021. Sur six grandes catégories d'aliments, les souches se répartissent en quatre sérotypes et 83 complexes clonaux (CC). Ces résultats descriptifs montrent que les CC121 et CC9 sont majoritairement isolés, comme cela est décrit dans la littérature pour des souches d'origine alimentaire. Ils ont également permis d'identifier des clusters génomiques suggérant une persistance de souches de *Lm* ou la réintroduction par un intrant, dans certains lieux de transformation ou de stockage, ainsi que la présence de souches associées à une hypervirulence dans différents types de denrées alimentaires prêtes à consommer d'origine végétale ou animale. Les conclusions mettent en avant des axes d'optimisation du dispositif de surveillance génomique des *Lm* dans les aliments, impliquant le réseau de laboratoires officiels supervisé par le LNR et souligne l'intérêt des interactions avec le Centre National de Référence *Listeria* (CNR) en charge des alertes et de la surveillance des cas de listériose humaine pour une vision la plus exhaustive possible compatible avec la gestion des risques.

Mots clés : Contrôles officiels, plans de surveillance, plans de contrôle, *Listeria monocytogenes*, aliments, WGS, génomique

Abstract

Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods - Results of official controls 2019-2021

Listeria monocytogenes (*Lm*) is a pathogenic bacteria responsible for listeriosis, which is transmitted mainly via the food chain. The characterization of strains isolated from the agri-food chain contributes to a better understanding of their ecology, and to the assessment of food-related health risks. In this frame, the National Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* (NRL) has been committed since 2019 to the systematic genomic characterization of strains isolated from official controls. This article describes the organization set up for this characterization and presents the results obtained over the 2019-2021 period. Out of six major food categories, the strains are divided into four serotypes and 83 clonal complexes (CC). These descriptive results show that CC121 and CC9 are predominantly isolated, as described in the literature for food-borne strains. They also identified genomic clusters suggesting the persistence of *Lm* strains in certain processing or storage sites, as well as the presence of strains associated with hypervirulence in different types of ready-to-eat foods of plant or animal origin.

The conclusions highlight areas for optimizing the genomic surveillance of *Lm* in foodstuffs, involving the network of official laboratories supervised by the NRL, and underline the importance of interactions with the National Reference Centre *Listeria* (NRC) in charge of alerts and surveillance of cases of human listeriosis, to ensure the most exhaustive possible view compatible with risk management.

Keywords: Official controls, surveillance plans, control plans, *Listeria monocytogenes*, food, WGS, genomics

Listeria monocytogenes (*Lm*) est une bactérie pathogène pour l'Homme et l'animal, responsable de la listériose, dont la voie de contamination est principalement alimentaire. Cette maladie est à déclaration obligatoire depuis 1998 chez l'Homme. Elle est rare, mais est l'une des plus sévères infections d'origine alimentaire, avec un taux de létalité rapporté au niveau européen de l'ordre de 18% et un taux d'hospitalisation supérieur à 90% (European Food Safety Authority et European Centre for Disease Prevention and Control 2021; 2022). Dans la majorité des cas, les symptômes initiaux de la listériose se présentent sous des formes non-invasives asymptomatiques ou avec de faibles symptômes peu spécifiques et variables selon les individus (états grippaux ou diarrhée modérée). La majorité des personnes, chez qui le diagnostic est confirmé, ont une forme dite « invasive » de la maladie (bactériémies, infections neurologiques, infections materno-néonatales). Les facteurs de risque d'infection comprennent les âges extrêmes (nouveau-nés et personnes âgées), l'alcoolisme, les tumeurs malignes, la corticothérapie, l'immunosuppression, le diabète sucré, les maladies hépatiques ou rénales et la surcharge en fer (Brouwer et Beek 2017). Chaque année, en France, 400 à 450 cas de formes invasives de listériose sont recensés.

Lm est ubiquitaire du fait de sa capacité à se multiplier selon un large spectre de conditions physico-chimiques et de températures. Ses propriétés psychrophiles la définissent, par ailleurs, comme un danger microbiologique à surveiller plus particulièrement dans les aliments réfrigérés prêts à être consommés et dans leur environnement de production. Dans ce contexte, la maîtrise des risques de listériose repose sur un ensemble de mesures de surveillance et de contrôle et de gestion des alertes mis en œuvre à chaque étape de la chaîne agro-alimentaire par les exploitants et les autorités de contrôle, et complété par les bonnes pratiques des consommateurs (Danan et Calavas 2016).

Par ailleurs, les souches de *Lm* se répartissent en 5 génosérogroupe PCR et présentent une grande diversité caractérisée par différentes approches de typage moléculaire (PCR, MLST ou cgMLST). Certaines souches sont particulièrement associées aux cas humains (génosérogroupe IVb) (Maury *et al.* 2016; Chenal-Francois *et al.* 2011; Kurpas *et al.* 2020; Félix *et al.* 2018; Maury *et al.* 2019).

¹ Règlement (CE) N°2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires

La caractérisation des souches isolées de la chaîne agro-alimentaire contribue à mieux connaître la diversité des souches selon leur niche écologique et à évaluer les risques sanitaires liés aux aliments. Dans cette perspective, le LNR (Anses, Maisons-Alfort) s'est engagé dans la caractérisation génomique systématique des souches isolées des contrôles officiels. Cette activité contribue à :

- mettre à disposition des autorités compétentes et des organismes en charge de la santé publique, des données destinées à mieux comprendre les origines et la diffusion des contaminations. En complément aux informations épidémiologiques décrivant le prélèvement, ces données peuvent être exploitées en collaboration avec le CNR (Institut Pasteur, Paris), la Direction Générale de l'Alimentation, et Santé publique France (SpF, Paris), en cas d'investigation de cas humains ;
- acquérir de nouvelles données alimentant les activités d'appui à la surveillance du LNR auprès des autorités compétentes ou d'autres gestionnaires de dispositifs de surveillance (*article L. 201-14 du Code rural et de la pêche maritime*) ;
- constituer un patrimoine biologique mis à disposition de la communauté scientifique pour les travaux d'évaluation du risque, de développement méthodologique et/ou de recherche.

Les objectifs de cette étude sont de décrire l'organisation mise en place par le LNR pour la caractérisation des souches de *Lm* isolées d'aliments dans le cadre des contrôles officiels et les résultats obtenus sur la période 2019-2021. Les conclusions permettent également d'émettre des recommandations pour l'optimisation globale du dispositif national de surveillance de *Lm* dans les aliments.

Matériel et méthodes

Dispositifs de surveillance ou de contrôle

La surveillance microbiologique des aliments repose sur des critères réglementaires relatifs à des catégories d'aliments considérés comme les plus à risque pour le consommateur¹ complété, pour les autres aliments, par l'article 14 du règlement EC

N°178/2002² relatif à la sécurité des denrées alimentaires mises sur le marché. Les critères concernant *Lm* tiennent compte des caractéristiques physico-chimiques des denrées alimentaires, des catégories de consommateurs à risque, de la capacité de croissance de *Lm* dans l'aliment et du stade de la chaîne alimentaire où est réalisé le prélèvement. En première intention, les exploitants doivent intégrer ces critères dans leurs

plans de maîtrise sanitaire et les autorités sanitaires vérifient le respect des principes généraux de la législation alimentaire en maintenant un système de contrôles officiels de second niveau. La **figure 1** schématise les contextes de surveillance de *Lm* aux différentes étapes de la chaîne alimentaire, de la production primaire jusqu'à l'étape de distribution aux consommateurs.

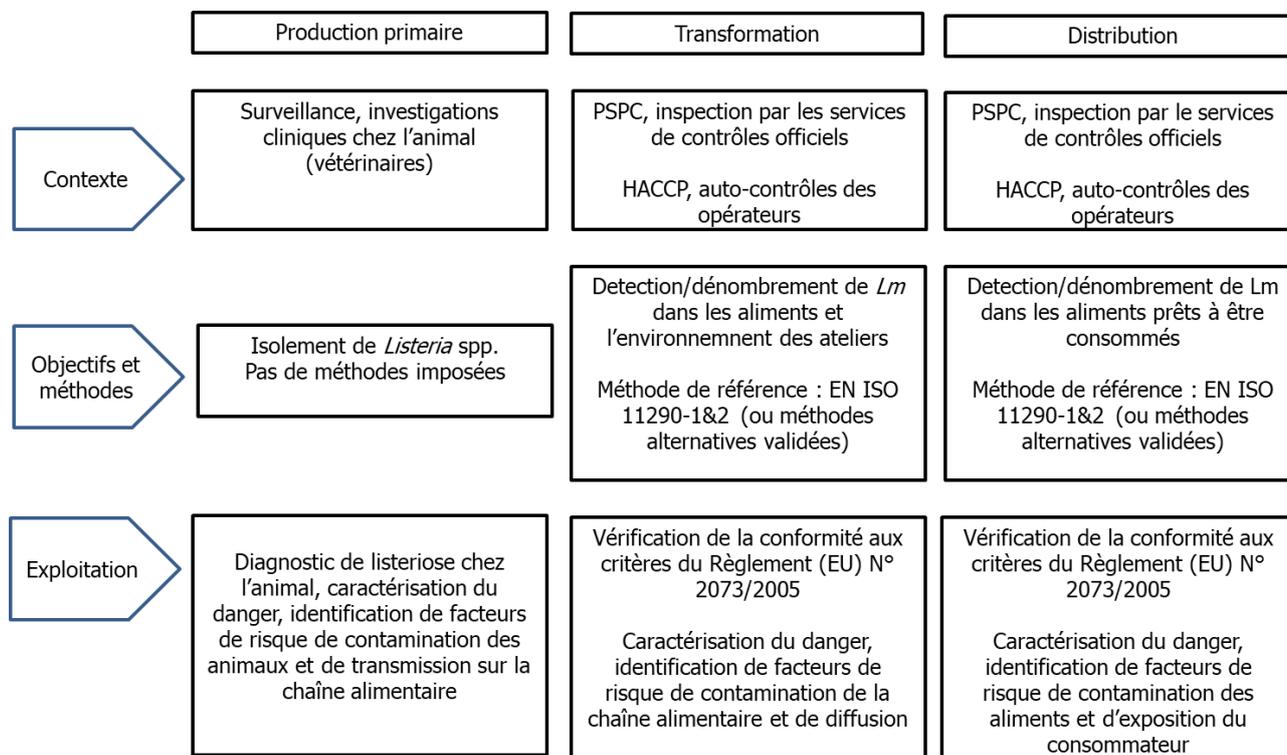


Figure 1 : Contexte général de la surveillance de *Lm* sur la chaîne agro-alimentaire (adaptée du rapport annuel sur la surveillance des zoonoses en Europe: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/7666>)

Sur la période de cette étude, avant la mise en place en 2023, d'un pilotage unique de la police en charge de la sécurité sanitaire des aliments³, la surveillance officielle de *Lm* dans les aliments reposait chaque année sur des plans de surveillance (PS) de la Direction générale de l'alimentation (DGAL), et des plans de contrôle (PC) de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF).

Chaque année, les orientations et le dimensionnement des PS/PC sont programmés à l'avance après échange entre les autorités compétentes, les LNR, les évaluateurs des risques (Direction d'évaluation des risques de l'Anses) et de Santé publique France, afin d'identifier les priorités

en termes de surveillance et de contrôle. Ces PS/PC présentent des stratégies distinctes d'échantillonnage conformément à leurs objectifs spécifiques (Bordier 2015).

Les PS visent à évaluer le niveau de contamination prévisible d'une « population » d'aliments, à un stade de la production ou de la distribution. Le plan d'échantillonnage (nombre de prélèvements, nature des aliments, zones géographiques) est défini et programmé à l'avance. L'échantillonnage des prélèvements est organisé de sorte à assurer la représentativité de cette « population ». Ainsi, lorsque l'objectif est d'évaluer un niveau de contamination à un stade de la production, le PS vise les entreprises fabriquant les plus gros volumes

² Règlement (CE) n° 178/2002 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

³ Sécurité sanitaire des aliments : une police unique pour protéger le consommateur | Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire

de l'aliment concerné au niveau national et le nombre d'échantillons prélevés dans chaque entreprise est fonction du tonnage produit. Lorsque l'objectif final est d'évaluer l'exposition du consommateur, les prélèvements sont organisés à la distribution, selon la répartition de la population dans les différents départements.

Les PC ont vocation principale à identifier des situations présentant un risque accru pour le consommateur. Pour des questions d'organisation et de gestion, le volume global des analyses et la nature des aliments à contrôler sont fixés à l'avance, mais leur mise en œuvre se fait en temps réel, en fonction des situations rencontrées sur le terrain. Les PC concernant *Lm* organisés par la DGCCRF visent exclusivement le stade de la distribution et concernent toutes les régions. Les critères de ciblage reposent sur la connaissance des situations de terrain par les services officiels, notamment dans le cas de suspicion d'une perte de maîtrise sanitaire par l'opérateur, ou d'investigation avec contrôles renforcés liée à des aliments contaminés.

Ces deux types de dispositifs s'appuient, pour les prélèvements, sur les services déconcentrés des Directions Départementales (de l'emploi, du travail, des Solidarités) de la Protection des Populations (DD(ETS)PP), et pour les analyses, sur des réseaux de laboratoires officiels composés de plus de 60 laboratoires agréés par la DGAL (agrément A), et quatre laboratoires du service commun des laboratoires au service de la DGCCRF⁴.

Tableau 1. Plans de contrôle et de surveillance mis en œuvre sur la période 2019-2021

| Plan | Année | Nom du plan | Analyte | Stade de prélèvement | Nombre de prélèvement | Nombre de souches reçues au LNR |
|----------------------------------|-------|------------------------|---|----------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Plan de contrôle (PC) | 2019 | TN*32(LA, LB, LC, LHA) | Matrices alimentaires variées | Distribution | Inconnu | 81 |
| | 2020 | TN32(MA, MB, MC) | | Distribution | Inconnu | 57 |
| | 2021 | TN32(NA, NB, NC) | | Distribution | Inconnu | 45 |
| Plan de surveillance (PS) | 2019 | 2019-846 | Sandwich et salades composées | Production et distribution | 300 | 7 |
| | 2020 | 2020-63 | Produits de la pêche fumés et crustacés cuits | Distribution | 440 | 19 |
| | 2021 | 2020-819 | | Distribution | 440 | 25 |

* : TN « Tache Nationale » : instructions décrivant les modalités de contrôles annuelles de la conformité sanitaire des aliments par les services d'inspections déconcentrés de la DGCCRF ; chaque plan est référencé par un code interne à l'administration. **Tableau 1**

⁴ Laboratoires officiels et reconnus en alimentation | Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire

Contexte du typage des souches

En complément des exigences réglementaires, une caractérisation des souches de *Lm* s'est mise en place au niveau national pour alimenter l'évaluation des risques et participer à l'investigation de cas de listériose humaine. Dans ce dispositif, le CNR est l'interlocuteur principal des autorités de santé ; il reçoit les souches de *Lm* associées aux « alertes produits » impliquant, selon les cas, un retrait voire un rappel de produits non conformes, et la mise en place d'actions correctives, tel que prévu dans le guide national de gestion des alertes alimentaires⁵, et celles prélevées autour d'un ou de cas humains... En parallèle, le LNR reçoit des laboratoires officiels, les souches isolées des aliments prélevés dans le cadre des PS/PC, quel que soit le niveau de contamination détecté dans l'aliment. Les instructions prévoient qu'une souche par prélèvement contaminé soit envoyée au LNR, accompagnée d'une fiche descriptive du prélèvement.

La caractérisation génomique systématique des souches de PS/PC, méthode de typage du CNR depuis 2017, a été mise en œuvre par le LNR courant 2019. Cet article présente les résultats obtenus sur la période 2019- 2021 à partir des plans listés dans le tableau 1. Sur la période, 183 et 51 souches ont été reçues respectivement des PC et des PS, à raison d'une souche par échantillon positif.

⁵ Comment fonctionne le système d'alerte alimentaire ? | Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire

Méthodes de caractérisation génomique des souches

Les souches ont été caractérisées par séquençage complet du génome (WGS) par la technologie Illumina.

Les préparations des bibliothèques et le séquençage ont été sous-traités à l'Institut du Cerveau (ICM, Paris) de 2019 à août 2022, puis à partir de septembre 2022 à Eurofins (Allemagne).

Le contrôle qualité, la normalisation des données de séquençage et l'assemblage ont été réalisés à l'aide d'outils développés en interne à l'Anses :

- ArtWORK (Felten 2020) pour la période 2019 à juin 2022 ;
- BacFlow développé par le Service Partagé d'Appui à l'Analyse des Données (SPAAD) (détection des contaminations par Kraken2 et Confidr et assemblage Shovill) à partir de juillet 2022. La profondeur de couverture minimale utilisée suit les recommandations techniques de l'EFSA (EFSA Panel on Biological Hazards (EFSA BIOHAZ) et al. 2019), celle-ci est acceptée dès 30X.

Les analyses génomiques ont été effectuées à l'aide de la plateforme BIGSdb-Lm (Moura et al. 2016), version 1.42.0, hébergée et gérée par le CNR/CCOMS *Listeria*, sous un projet commun privé LNR-CNR. L'exhaustivité des souches isolées des PS/PC est ainsi assurée par le dépôt des séquences génomiques de toutes les souches isolées de PS/PC.

La plateforme BIGSdb-Lm permet l'analyse WGS, donc la détermination des éléments suivants, du moins au plus discriminant :

- le sérotype moléculaire (Hyden et al. 2016) comparable à la méthode de biologie moléculaire anciennement utilisée par l'Anses (Doumith et al. 2004) ;
- les lignées et sous-lignées, groupes de souches en fonction de leur génosérogroupe PCR, aussi appelé sérotype. La lignée génétique I contient les génosérogroupe PCR IIb et IVb, tout en se référant aux génosérogroupe PCR IIa et IIc en tant que lignée II (Moura et al. 2016).
- les complexes clonaux (CC), groupes de souches partageant au moins six allèles identiques parmi les sept gènes de ménage (Ragon et al. 2008). Cette classification repose sur un schéma public souvent utilisé au niveau Européen ou mondial pour permettre d'utiliser un même typage ;
- le Sequence Type (ST), correspondant à l'analyse de sept gènes de ménage par le schéma Multi

Locus Sequence Type (MLST) (Ragon et al. 2008). Son intérêt réside dans le fait que la méthode utilise une nomenclature internationale harmonisée ;

- le cgMLST Type (CT), correspondant à l'analyse de 1748 gènes de ménage à l'aide du schéma core-génome MLST (cgMLST) développé par l'Institut Pasteur (Moura et al. 2016). Les CT obtenus sont spécifiques des algorithmes utilisés et donc des bases de données utilisées pour l'analyse. La comparaison des profils cgMLST permet de déterminer si les souches sont proches génétiquement ou non. Un cluster de souches est ainsi défini par la mise en évidence d'au moins deux souches ayant au plus 7 allèles de différence d'un même CT, après avoir éliminé les doublons (souches de même CT isolées d'un même lot de prélèvement).

L'ensemble des analyses est réalisé sous assurance qualité (ISO/CEI 17025:2017).

Résultats

Collecte des souches

La **figure 2** illustre la répartition géographique des prélèvements desquels ont été isolées les souches transmises au LNR pour les PC ou les PS. Sur la période 2019-2021, 183 et 51 souches ont été reçues respectivement des PC et des PS. La distribution des prélèvements est cohérente à l'organisation des plans : répartition des prélèvements à l'initiative des services de contrôle sur l'ensemble du territoire dans les cas des PC, et répartition des prélèvements encadrée par les instructions dans les cas de PS. Cette observation est un indicateur de la bonne mobilisation des laboratoires dans la transmission des souches au LNR.

En termes de réactivité du dispositif, la majorité des souches est réceptionnée sous 50 jours. Le nombre de jours médian entre le prélèvement de l'aliment et la réception de la souche est, toutes années confondues, de 98 jours pour les PC et 37 jours pour les PS. Une partie des souches semble être envoyée par lots en cours d'année voire au cours de l'année suivante jusqu'à 531 jours après le prélèvement, indépendamment de leur date d'isolement, voire, pour quelques-unes, après la clôture des plans annuels. Cependant, l'année 2020 a été marquée par la crise liée au Covid-19 et les délais ont été rallongés dû au contexte sanitaire.

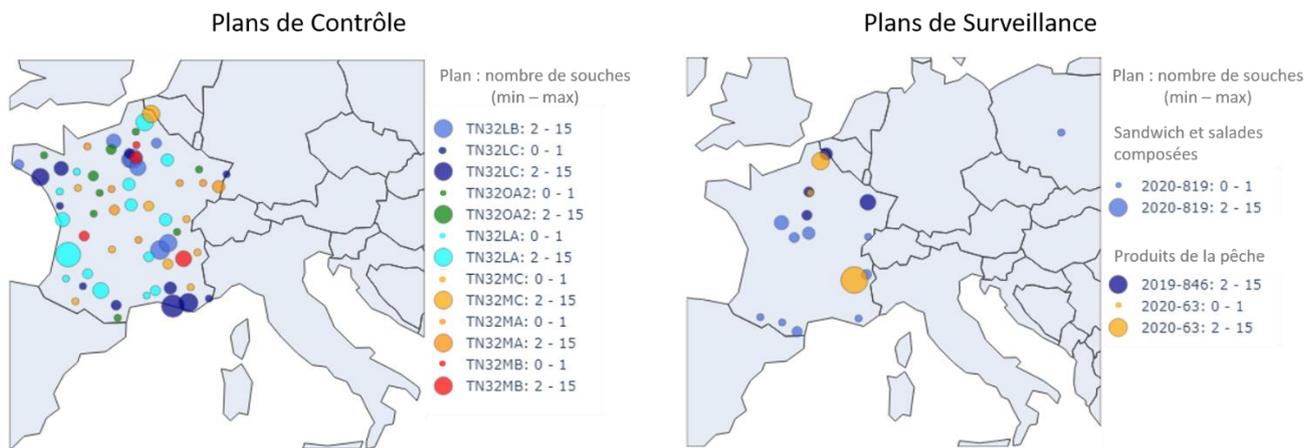


Figure 2. Répartition du nombre de souches en fonction de la provenance géographique des prélèvements alimentaires positifs d'où ont été isolées les souches et en fonction du contexte PS ou PC (années 2019, 2020 et 2021)

Typage des souches

Au total, 227 sur 234 souches reçues ont été intégrées dans ce bilan, tous plans confondus.

Six souches issues de PC réceptionnées en début d'année 2019 n'ont pas été analysées avec les nouveaux outils génomiques ultérieurement mis en place. Une souche reçue de PC en 2019 n'a pas pu être analysée du fait d'une contamination importante rendant l'isolement de *Lm* impossible.

Les 227 souches se répartissent en quatre géosérogroupes PCR: IIa, IIb, IIc et IVb. La majorité des souches (68% des souches) appartient au géoséro groupe PCR IIa (PC : 114/176 souches et PS : 40/51 souches). Ce géoséro groupe PCR est principalement retrouvé pour les souches isolées du PS « produits de la pêche fumés et crustacés cuits » et des PC sur des « produits carnés » et « produits de la pêche ». Les géosérogroupes PCR IVb, IIb et IIc représentent respectivement (12%, 11% et 9% des souches reçues). Ils sont retrouvés dans diverses matrices: « produits carnés », « produits de la pêche », « plats cuisinés » et « produits végétaux » (figure 3). Le géoséro groupe PCR IVb a été majoritairement retrouvé pour les souches isolées de « produits végétaux » dans le cadre des PC.

La figure 3 présente six catégories d'aliments desquelles les souches ont été prélevées: les « produits végétaux », les « produits carnés », les « aliments à multiples composants », les « produits de la pêche », le « chocolat, produits de pâtisserie et confiserie » et enfin les « produits laitiers ». Les « produits végétaux » regroupent tous les légumes seuls ou en mélange. Ensuite, la catégorie « produits

carnés » contient les viandes à l'état non transformé (poulet, veau, porc, bœuf), ainsi que transformées (charcuterie, farce, saucisserie). Il en est de même avec les « produits de la pêche » contenant des poissons (saumon, truite notamment) fumés ou non, ainsi que des produits transformés tels que les sushis et tarama. La catégorie des « aliments à multiples composants » contient majoritairement des sandwichs et des salades. La catégorie « chocolat, produits de pâtisserie et confiserie » contient une seule pâtisserie. La dernière catégorie « produits laitiers » se résume à un prélèvement de fromage.

La figure 4 présente six catégories d'aliments desquelles les souches ont été prélevées: les « produits végétaux », les « produits carnés », les « aliments à multiples composants », les « produits de la pêche », le « chocolat, produits de pâtisserie et confiserie » et enfin les « produits laitiers ». Les « produits végétaux » regroupent tous les légumes seuls ou en mélange. Ensuite, la catégorie « produits carnés » contient les viandes à l'état non transformé (poulet, veau, porc, bœuf), ainsi que transformées (charcuterie, farce, saucisserie). Il en est de même avec les « produits de la pêche » contenant des poissons (saumon, truite notamment) fumés ou non, ainsi que des produits transformés tels que les sushis et tarama. La catégorie des « aliments à multiples composants » contient majoritairement des sandwichs et des salades. La catégorie « chocolat, produits de pâtisserie et confiserie » contient une seule pâtisserie. La dernière catégorie « produits laitiers » se résume à un prélèvement de fromage.

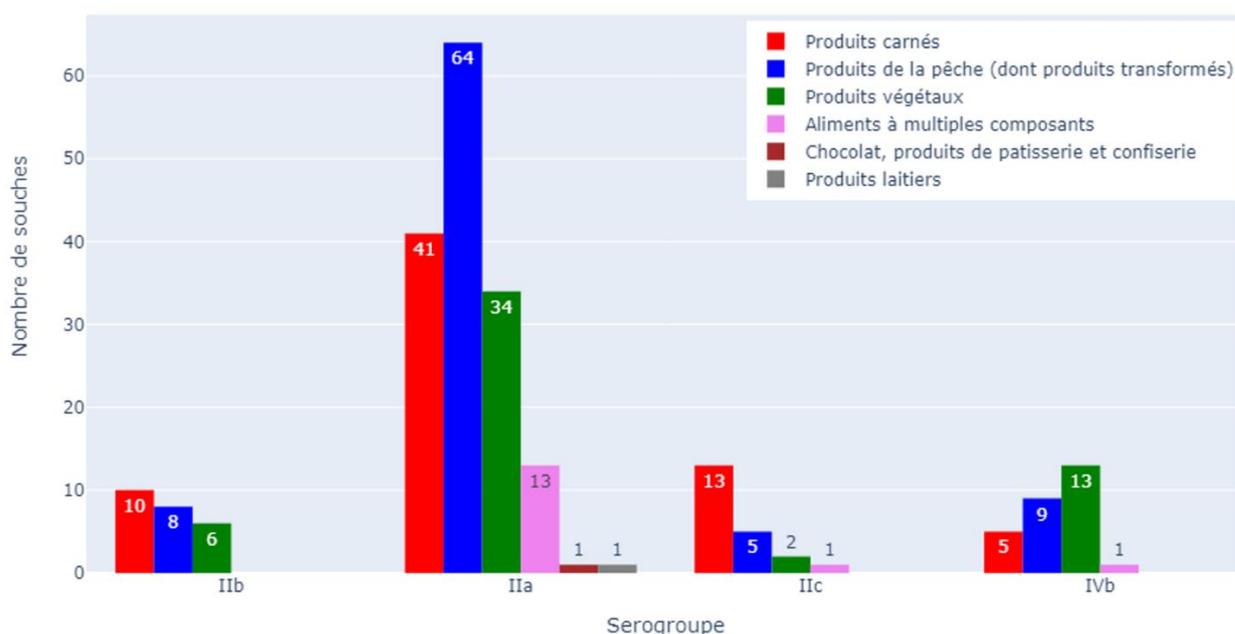


Figure 3. Répartition des matrices en fonction des sérotypes des souches isolées de ces matrices.

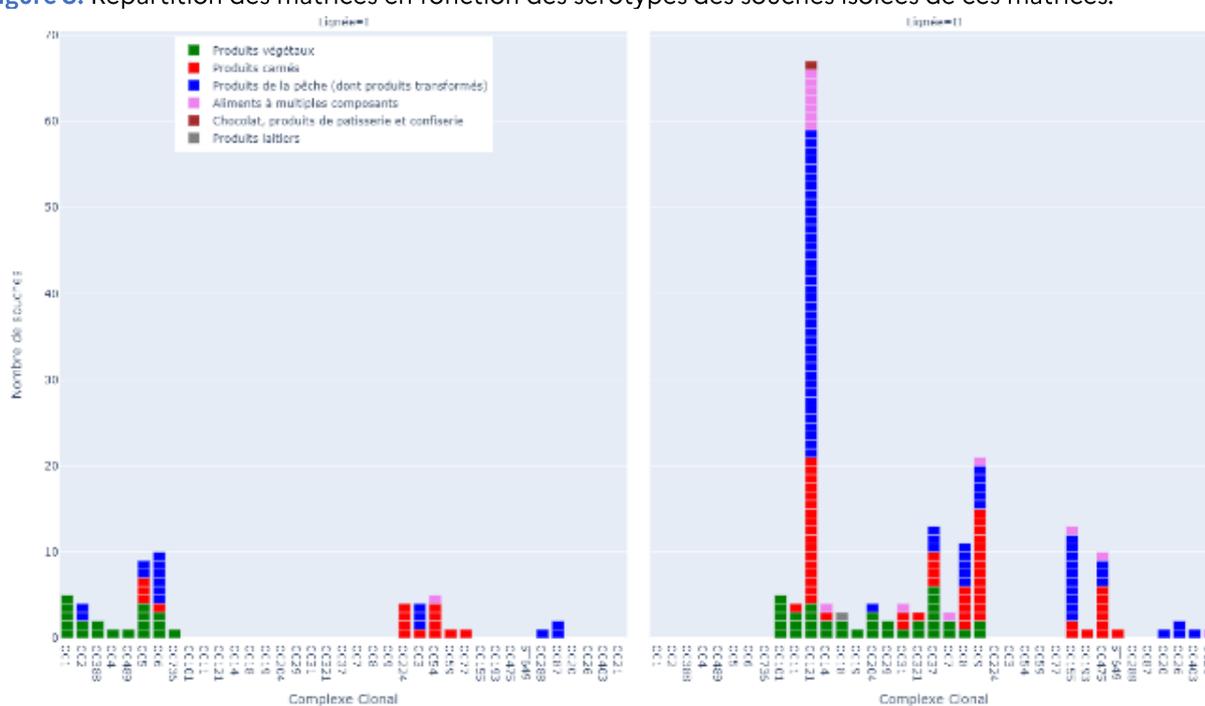


Figure 4. Répartition des CC des souches en fonction des matrices prélevées.

Tous plans confondus, les 227 souches se répartissent en 38 CC. Vingt-deux CC ont été identifiés dans des produits végétaux (n=54 souches), 18 CC dans des produits carnés (n = 69 souches), 17 CC dans les produits de la pêche (n=87 souches), et neuf CC dans des produits composés (n = 15 souches). Les CC majoritaires sont les CC121 (30 % des souches reçues), suivi des CC9 (9 %), CC155 (6 %), CC37 (6 %) et CC475 (4 %) (figure 4) (génosérogroupe PCR IIa et IIc).

Les CC1, CC2, CC4 et CC6 connus pour être associés à une hypervirulence chez l’Homme (génosérogroupe PCR IVb), sont retrouvés

principalement dans des produits végétaux : champignons de Paris (PC 2019 : 3 CC1 et 1 CC6; PC2020 : 1 CC1), épinards (PC 2019 : 1 CC4; PC2020 : 1 CC6), choux de Bruxelles (PC 2021 : 1 CC1), mélange de légumes vapeur (PC 2021 : 1 CC6) et fruits (PC 2019 : 1 CC2). Le CC6 a également été isolé dans de la truite fumée (PS 2021) et du jambon blanc (PC 2020), et le CC2 dans des poissons (PC 2019).

Analyse de proximité génomiques de souches

Pour cette analyse, un total de 241 génomes a été analysé par cgMLST dont les 227 génomes issus de

souches appartenant à la collection du LNR, auxquels ont été ajoutés quatorze génomes appartenant à celle du CNR (souches alimentaires). Les souches du CNR sont des souches isolées d'« alertes produits » sur la période 2019-2021. Les produits concernés étaient principalement des saumons fumés ou des produits transformés à base de viande. Les 241 séquences se répartissent en 141 CT à partir desquels une étude de la proximité génomique peut permettre d'identifier des clusters. Trente-six clusters regroupant au moins deux souches avec le même CT ont été obtenus. Parmi ceux-ci, 26 clusters ont deux génomes (identifiés par des zones vertes dans la [figure 5](#)) et dix clusters ont de trois à 17 génomes. Dix comprennent plus de deux génomes (identifiés par des zones vertes dans la [figure 5](#)).

Certains clusters regroupent des souches des PS et du CNR.

Ainsi, le cluster (L2-SL155-ST155-CT5098, génotype PCR IIa) qui regroupe dix génomes de dix souches isolées de saumon fumé prélevé dans la cadre du PS 2020 a été complété par cinq génomes de la même année collectés par le CNR.

L'autre cluster (L2-SL9-ST9-CT597, génotype PCR IIc) regroupe trois génomes de souches isolées dans le cadre du PS 2021, et un génome de 2020 du CNR, toutes sont issues de saumon fumé également.

Le cluster (L1-SL6-ST6-CT461, génotype PCR IVb) regroupe quant à lui six génomes de souches toutes isolées de truites fumées prélevées dans le cadre du PS 2021 suggérant un lien épidémiologique contrairement au cluster (L2-SL121-ST121-CT903, génotype PCR IIa) dont les génomes sont majoritairement issus de souches isolées de prélèvements de crevettes, l'attribution du CT y associe deux génomes non reliés épidémiologiquement, ayant plus de 7 différences alléliques. Ce cas nécessiterait une investigation plus poussée. Le cluster (L2-SL475-ST504-CT941, génotype PCR IIa) est majoritairement issu de souches isolées de viande de poulet et de sandwichs à base de viande. Dans ce cluster, est retrouvée une souche provenant d'un prélèvement issu de saucisse séchée tranchée, indiquant qu'elle est également proche génétiquement proches des autres souches. Il serait intéressant de connaître les lieux et processus de transformations industriels pour savoir si elles ont un réel lien épidémiologique.

Quatorze clusters concernent des souches isolées de matrices cohérentes sur plusieurs années de prélèvements (identifiés en bleu ou avec une étoile bleue dans la [figure 6](#)). Cela pourrait indiquer une persistance de ces souches dans les usines de

production ou de transformation de ce type de matrice. Par exemple, le cluster (L2-SL121-ST121-CT10083, génotype PCR IIa), le plus important en nombre de génomes (dix-sept génomes), est lié à des souches isolées de sushi industriels, prélevés sur trois années au stade de la distribution.

Discussion

Les résultats de cette étude descriptive permettent d'apprécier la diversité des souches de *Lm* isolées d'aliments prélevés dans le cadre des PS/PC. Sur six grandes catégories d'aliments, les souches se répartissent en quatre génotypes PCR et 83 CC.

Vingt et un CC ont été identifiés dans des produits végétaux, dix-huit CC dans des produits carnés, dix-sept CC dans les produits de la pêche et neuf dans des produits composés.

Ces résultats sont cohérents avec la revue de la littérature, notamment les CC121 et CC9 (génotype PCR IIa et IIc) majoritairement isolés, qui sont décrits dans la littérature nationale, européenne et internationale comme souches prépondérantes dans les aliments (Chenal-Francisque et al. 2011; Kurpas et al. 2020; Maury et al. 2016; Félix et al. 2018; Maury et al. 2019). Il faut cependant garder à l'esprit qu'au niveau international, certains CC peuvent avoir un tropisme particulier en fonction des zones géographiques. Le CC9 est principalement isolé de produits carnés, comme décrit par Felix et col. (Félix et al. 2018) pour la filière porcine en France. La fréquence d'isolement relativement élevée du CC155 isolé dans du saumon fumé, doit être interprétée avec prudence. Ce CC a été retrouvé dans le cadre du PS 2020 qui, par définition, vise à déterminer la représentativité de la contamination d'une filière, à un stade de la chaîne alimentaire. Néanmoins, il conviendrait de vérifier que ces résultats n'aient pas été biaisés par des doublons de prélèvement sur des lots identiques, comme cela peut être le cas dans un contexte d'investigation. Ce CC n'est par ailleurs pas retrouvé dans le cadre des PC mais a en revanche été décrit, principalement dans les produits de la mer, dans une étude menée en 2019 (Maury et al. 2019). Cependant ce CC155 n'est pas décrit dans une étude descriptive portant sur près de 700 souches de *Lm* isolées du secteur de production de saumons et de truites en France (Brauge et al. 2023). Dans la configuration actuelle du dispositif, les données épidémiologiques communiquées au LNR sont insuffisantes pour écarter, en temps réel, ces biais de prélèvement.

indépendance des prélèvements, mais pour ce qui relève des fraudes, cette information reste confidentielle et relève des situations rencontrées sur le terrain. Ce dédoublement est également un gage de rationalisation des coûts associés aux analyses génomiques. Il représente néanmoins une limite dans la connaissance d'une éventuelle diversité de la contamination d'un même aliment.

- En termes d'exhaustivité, toutes les souches de *Lm* sont à transmettre à l'Anses dans le cadre des PS/PC, quel que soit le niveau de contamination du prélèvement. Cette particularité distingue l'activité du LNR, des activités du laboratoire officiel responsable de l'interprétation de la conformité du prélèvement. Les laboratoires s'assureront également que les autres espèces de *Listeria* ne soient pas transmises. Cette exhaustivité permettrait de connaître le taux de contamination des différentes matrices par type de souche. Dans cette perspective d'optimisation, le LNR s'est engagé, en 2023, dans le projet QUALIPLAN piloté par l'Anses. En relation étroite avec les laboratoires et les services de contrôle, le LNR supervisera au fil de l'eau la bonne application des différentes instructions de la DGAL et la qualité des données rapportées. Pour les PC, le nombre de prélèvements réalisés chaque année est une information confidentielle des services des fraudes ne permettant pas cette estimation, et qui ne représenterait par ailleurs que des situations à risque plus élevé, non représentatives des aliments mis sur le marché.
- Il est également indispensable que les informations épidémiologiques décrivant le prélèvement soient exhaustives et précises pour permettre toute interprétation des résultats analytiques (numéro de plan, origine géographique par ex.). La transmission au LNR du Document d'accompagnement des prélèvements (DAP) des PS devrait être demandée dans les prochaines campagnes.
- En termes de réactivité, la fréquence d'envoi des souches par les laboratoires devrait être

réduite globalement. Deux situations sont cependant à distinguer :

- i) lorsque la souche génère une « alerte produit », le dispositif de centralisation des données et de caractérisation au CNR doit permettre de mettre à disposition des services sanitaires, les informations dans un temps compatible avec les actions de gestion
 - ii) lorsque la souche ne génère pas « d'alerte produit », il peut être recommandé que les souches soient transmises le plus régulièrement possible au LNR au cours de l'année civile, par groupe de dix souches si beaucoup de souches sont isolées. Pour dynamiser le dispositif, là encore, le rôle d'animateur du LNR est primordial. La transmission plus rapide des souches au LNR conduirait, de fait, à l'obtention et à un partage plus rapide de résultats avec le CNR pour leur intégration dans la surveillance nationale et une protection du consommateur.
- D'un point de vue analytique, les résultats de surveillance sur les clusters génomiques pourraient être complétés par une activité de recherche sur les gènes d'intérêt (virulence, persistance aux biocides) qui, à termes et sous réserve de validation, pourrait aider les industriels à mieux comprendre leurs contaminations et les accompagner dans les mesures à mettre en place.
 - En termes de santé publique, le partage des résultats de caractérisation génomique des souches obtenus par le LNR ou le CNR, via la plateforme BIGSdb-*Lm*, se poursuivront afin de renforcer un niveau de vigilance nationale, en identifiant le maximum de contaminations susceptibles de représenter un risque pour le consommateur. Au niveau européen, ces données peuvent être partagées par le LNR, dans la base européenne « One Health WGS system », depuis juillet 2022⁶. Ce dispositif conjoint EFSA/ECDC, repose sur le volontariat des Etats membres à partager leurs données. Son objectif est de détecter rapidement les épidémies d'origine alimentaire impliquant plusieurs pays. Actuellement, en France, ce partage est ponctuel et n'est effectué que sur demande des autorités sanitaires.

⁶ WGS Portal (europa.eu)

En conclusion, cette étude établit un bilan original de la caractérisation génomique des souches de *Lm* isolées d'aliments visés par les PS/PC des autorités sanitaires nationales. Elle souligne toute l'importance du rôle du LNR dans l'animation du réseau de laboratoires officiels et de l'importance des échanges réguliers avec le CNR pour une vision la plus exhaustive possible de la situation dans des temps compatibles avec la gestion des risques. Ces résultats sont complémentaires des bilans publiés par l'administration sur leurs activités officielles (« Plans de surveillance et de contrôle » 2022). Ils permettent d'identifier des points d'optimisation du fonctionnement du dispositif sanitaire pour le rendre encore plus réactif et exhaustif, ainsi que des secteurs de production associés à un risque plus élevé. Il convient cependant de souligner qu'ils ne préjugent pas de la conformité des aliments mis sur le marché, ni des mesures de gestion mises en place pour les aliments détectés non conformes.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les bureaux des autorités de contrôle pour les échanges entre les activités scientifiques du LNR et les activités officielles des laboratoires d'analyse, les laboratoires officiels et les équipes de bio-informatiques de l'Anses, dont M^{me} Virginie CHESNAIS (SPAAD, ANSES LSA Maisons-Alfort) et M. Arnaud FELTEN (GVB – ANSES Ploufragan), pour le développement et le maintien des pipelines ayant permis l'analyse des reads bruts. L'équipe du LNR remercie également Marc LECUIT, responsable du CNR *Listeria* et Alexandra MOURA chercheuse au CNR pour les échanges scientifiques et techniques ayant permis ce bilan.

Références bibliographiques

Bordier, M. 2015. « Brève. Les plans de surveillance et les plans de contrôle au service de la vigilance sanitaire des aliments ». Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation, 68.

Brauge, T., Leleu G., Hanin A., Capitaine K., Felix B., et Midelet G. 2023. « Genetic Population Structure of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Salmon and Trout Sectors in France ». SSRN Scholarly Paper. Rochester, NY. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4441241>.

Brouwer, M. C. et van de Beek M. 2017. « MONALISA: a grim picture of listeriosis ». The Lancet Infectious Diseases 17 (5) : 464-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30054-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30054-3).

Chenal-Francisque V., Lopez J., Cantinelli T., Caro V., Tran, Leclercq A., Lecuit M., et Brisse S.. 2011. « Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes* ». Emerging Infectious Diseases 17

(6) : 1110-12. <https://doi.org/10.3201/eid1706.101778>.

Danan, C., et Calavas D. 2016. « Réflexions autour de la surveillance épidémiologique des aliments ». Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation, no 77. <https://be.anses.fr/sites/default/files/SSA01final.pdf>.

Doumith, Michel, Carmen Buchrieser, Philippe Glaser, Christine Jacquet, et Paul Martin. 2004. « Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR ». Journal of Clinical Microbiology 42 (8) : 3819-22. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>.

EFSA Panel on Biological Hazards (EFSA BIOHAZ), Kostas Koutsoumanis, Ana Allende, Avelino Alvarez-Ordóñez, Declan Bolton, Sara Bover-Cid, Marianne Chemaly, et al. 2019. « Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms ». EFSA Journal 17 (12) : e05898. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5898>.

European Food Safety Authority et European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. « The European Union One Health 2020 Zoonoses Report | EFSA ». <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2021.6971>.

European Food Safety Authority. 2022. « The European Union One Health 2021 Zoonoses Report | EFSA ». Consulté le 5 janvier 2024. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/7666>.

Félix, Benjamin, Carole Feurer, Aurelien Maillet, Laurent Guillier, Evelyne Boscher, Annaëlle Kerouanton, Martine Denis, et Sophie Roussel. 2018. « Population Genetic Structure of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From the Pig and Pork Production Chain in France ». Frontiers in Microbiology 9 : 684. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00684>.

Felten, Arnaud. 2020. « Github - afelten-Anses/ARTWORK ». GitHub. 2020. <https://github.com/afelten-Anses/ARTWORK>.

Hyden, Patrick, Ariane Pietzka, Anna Lennkh, Andrea Murer, Burkhard Springer, Marion Blaschitz, Alexander Indra, et al. 2016. « Whole genome sequence-based serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolates ». Journal of Biotechnology 235 (octobre) : 181-86. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.005>.

Kurpas, Monika, Jacek Osek, Alexandra Moura, Alexandre Leclercq, Marc Lecuit, et Kinga Wiczorek. 2020. « Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated From Ready-to-Eat

Meat and Meat Processing Environments in Poland ». *Frontiers in Microbiology* 11 : 1412. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01412>.

« Laboratoires officiels et reconnus en alimentation ». s. d. Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. Consulté le 6 juillet 2023. <https://agriculture.gouv.fr/laboratoires-officiels-et-reconnus-en-alimentation>.

Maury, Mylène M., Hélène Bracq-Dieye, Lei Huang, Guillaume Vales, Morgane Lavina, Pierre Thouvenot, Olivier Disson, Alexandre Leclercq, Sylvain Brisse, et Marc Lecuit. 2019. « Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products ». *Nature Communications* 10 (juin) : 2488. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10380-0>.

Maury, Mylène M., Yu-Huan Tsai, Caroline Charlier, Marie Touchon, Viviane Chenal-Francisque, Alexandre Leclercq, Alexis Criscuolo, et al. 2016. « Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence

by harnessing its biodiversity ». *Nature Genetics* 48 (3) : 308-13. <https://doi.org/10.1038/ng.3501>.

Moura, Alexandra, Alexis Criscuolo, Hannes Pouseele, Mylène M. Maury, Alexandre Leclercq, Cheryl Tarr, Jonas T. Björkman, et al. 2016. « Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes* ». *Nature Microbiology* 2 (octobre) : 16185. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.185>.

Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. 2022. « Plans de surveillance et de contrôle ». 16 novembre 2022. <https://agriculture.gouv.fr/plans-de-surveillance-et-de-contrôle>.

Ragon, Marie, Thierry Wirth, Florian Hollandt, Rachel Lavenir, Marc Lecuit, Alban Le Monnier, et Sylvain Brisse. 2008. « A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution ». *PLoS pathogens* 4 (9) : e1000146. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000146>.

Pour citer cet article :

Yvon C., Vesselle M., Leclercq A., Leclerc V., Fert D, Barre L., Danan C. 2023. « Caractérisation génomique de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer : bilan des contrôles officiels 2019-2021 » *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 99 (2) : 1-12.

Le Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation est une publication conjointe de la Direction générale de l'alimentation et de l'Anses.

Directeur de publication : Benoît Vallet

Directeur associé : Maud Faipoux

Directrice de rédaction : Emilie Gay

Rédacteur en chef : Julien Cauchard

Rédacteurs adjoints : Hélène Amar, Jean-Philippe Amat, Céline Dupuy, Viviane Hénaux, Renaud Lailier, Célia Locquet

Comité de rédaction : Anne Brisabois, Benoit

Durand, Françoise Gauchard, Guillaume

Gerbier, Pauline Kooh, Marion Laurent, Sophie

Le Bouquin Leneveu, Céline Richomme, Jackie

Tapprest, Sylvain Traynard

Secrétaire de rédaction : Virginie Eymard

Responsable d'édition :

Fabrice Coutureau Vicaire

Assistante d'édition :

Flore Mathurin

Anses - www.anses.fr

14 rue Pierre et Marie Curie

94701 Maisons-Alfort Cedex

Courriel : bulletin.epidemie@anses.fr

Sous dépôt légal : CC BY-NC-ND

ISSN : 1769-7166