

Comité d'experts spécialisé CES Évaluation des risques biologiques dans les aliments - CES BIORISK 2022-2026

Procès-verbal de la réunion du 15 février 2023

Considérant le décret n° 2012-745 du 9 mai 2012 relatif à la déclaration publique d'intérêts et à la transparence en matière de santé publique et de sécurité sanitaire, ce procès-verbal retranscrit de manière synthétique les débats d'un collectif d'experts qui conduisent à l'adoption de conclusions. Ces conclusions fondent un avis de l'Anses sur une question de santé publique et de sécurité sanitaire, préalablement à une décision administrative.

Les avis de l'Anses sont publiés sur son site internet (www.anses.fr).

Étaient présents le 15 février 2023 - Matin :

- Membres du comité d'experts spécialisé : Philippe FRAVALO (président de séance), Frédéric AUVRAY, Mickaël BONI, Frédéric BORGES, Gilles BORNERT, Catherine CHUBILLEAU, Monika COTON, Georges DAUBE, Noémie DESRIAC, Michel FEDERIGHI, Michel GAUTIER, Michèle GOURMELON, Sandrine GUILLOU, Stéphane GUYOT, Didier HILAIRE, Nathalie JOURDAN-DA SILVA, Claire LE MARREC, Sandra MARTIN-LATIL, Jeanne-Marie MEMBRÉ, Eric OSWALD, Nadia OULAHAL, Pascal PIVETEAU, Régine TALON, Isabelle VILLENA
- Coordination scientifique de l'Anses

Étaient absents ou excusés :

- Membres du comité d'experts spécialisé : Frédéric CARLIN, Florence DUBOIS-BRISSONNET, Sabine SCHORR-GALINDO

Étaient présents le 15 février 2023 - Après-midi :

- Membres du comité d'experts spécialisé : Philippe FRAVALO (président de séance), Frédéric AUVRAY, Mickaël BONI, Frédéric BORGES, Gilles BORNERT, Catherine CHUBILLEAU, Monika COTON, Georges DAUBE, Noémie DESRIAC, Michel FEDERIGHI, Michel GAUTIER, Michèle GOURMELON, Sandrine GUILLOU, Stéphane GUYOT, Didier HILAIRE, Nathalie JOURDAN-DA SILVA, Claire LE MARREC, Sandra MARTIN-LATIL, Jeanne-Marie MEMBRÉ, Eric OSWALD, Nadia OULAHAL, Pascal PIVETEAU, Sabine SCHORR-GALINDO, Régine TALON
- Experts rapporteurs : Mickaël DESVAUX, Gabrielle JONES
- Coordination scientifique de l'Anses

Étaient absents ou excusés :

- Membres du comité d'experts spécialisé : Frédéric CARLIN, Florence DUBOIS-BRISSONNET, Isabelle VILLENA

Présidence

Monsieur Philippe FRAVALO assure la présidence de la séance pour la journée.

1. ORDRE DU JOUR

L'expertise ayant fait l'objet d'une finalisation et d'une adoption des conclusions est la suivante :
« Demande d'appui relatif à la définition des souches pathogènes d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines - Avis - 2020-SA-0095 ».

2. GESTION DES RISQUES DE CONFLIT D'INTERETS

Le résultat de l'analyse des liens d'intérêts déclarés dans les DPI¹ et de l'ensemble des points à l'ordre du jour n'a pas mis en évidence de risques de conflits d'intérêts. En complément de cette analyse, le président demande aux membres du CES s'ils ont des liens voire des conflits d'intérêts qui n'auraient pas été déclarés ou détectés. Les experts n'ont rien à ajouter concernant les points à l'ordre du jour de cette réunion.

3. SYNTHÈSE DES DÉBATS, DÉTAIL ET EXPLICATION DES VOTES, Y COMPRIS LES POSITIONS DIVERGENTES

3.1. Demande d'appui relatif à la définition des souches pathogènes d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines

Contexte

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des souches pathogènes d'*E. coli* responsables de diarrhée ou de colite hémorragique pouvant s'aggraver en syndrome hémolytique et urémique (SHU), surtout chez le jeune enfant, le sujet âgé et/ou immunodéprimé.

L'avis de l'Anses du 18 mai 2017 indique que toute souche d'*E. coli* isolée chez l'Homme ou dans les aliments devrait être considérée comme une EHEC si elle possède les gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2* et *eae* ou d'autre(s) gène(s) codant un système d'adhésion au tube digestif de l'Homme. L'Agence avait établi dans cet avis une classification des souches en fonction de leur risque pour la santé publique en France, selon les critères définis par le panel BIOHAZ de l'EFSA en 2013 (sérotypes et facteurs de virulence) et en se fondant sur les données épidémiologiques françaises et européennes.

En 2018, un groupe d'experts FAO/OMS a proposé un ensemble de critères pour catégoriser les souches d'*E. coli* productrices de shigatoxines (STEC) en fonction du risque de forme clinique sévère (FAO/WHO 2018). Cinq niveaux de risque sont définis sur la base des profils de gènes de virulence. Le groupe conclut que le sérotype ne devrait pas être considéré comme un critère pour prédire la virulence des souches.

En janvier 2020, l'EFSA a publié l'avis du panel BIOHAZ concernant l'évaluation de la pathogénicité des STEC sur la base des données de santé publique disponibles en Europe (EFSA BIOHAZ Panel 2020). Cet avis conclut que toutes les souches de STEC sont pathogènes avec la capacité de causer *a minima* une diarrhée, et que tous les sous-types de STEC peuvent être associés à des maladies sévères chez l'Homme.

¹ DPI : Déclaration Publique d'Intérêts

L'Anses est saisie pour actualiser voire compléter la définition des souches pathogènes proposée dans l'avis de mai 2017 au vu de l'avis du panel BIOHAZ de l'EFSA (2020), du rapport FAO/OMS (2018) et des autres données et publications récentes qui pourraient alimenter la réflexion.

Les questions posées dans la saisine sont les suivantes :

- « *Sur la base des données de santé publique disponibles, quels sont les déterminants de la virulence des souches de STEC ?* »
- *Dans quelle mesure la prise en compte des sous-types du gène stx ou de tout autre facteur génétique permettrait-elle de rendre plus discriminante la typologie des souches de STEC proposée dans votre avis de mai 2017 au regard de leur niveau de pathogénicité ? »*

Organisation de l'expertise :

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'Anses a confié l'expertise initiale à cinq rapporteurs dont les travaux ont été présentés au CES BIORISK tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques les 24 octobre 2022, 22 novembre 2022, 20 décembre 2022 et 23 janvier 2023. Ils ont été adoptés par le CES BIORISK réuni 15 février 2023.

Synthèse des discussions

○ **Séance du 24 octobre 2022**

L'état d'avancement des travaux est présenté. Les points suivants sont abordés au cours de la discussion :

- La diversité des systèmes de surveillance des infections à STEC dans les différents États-membres de l'Union Européenne.
- La pertinence du séro groupe comme critère de pathogénicité des souches.
- La prise en compte des facteurs liés à l'hôte.
- Des demandes d'ajout au rapport :
 - Des éléments sur la modulation de l'expression de la virulence en fonction des conditions environnementales (procédé, matrice alimentaire, microbiote).
 - Une section sur les méthodes d'analyse des STEC dans les aliments.

○ **Séances du 22 novembre, 20 décembre 2022 et du 23 janvier 2023**

L'état d'avancement des travaux est présenté.

- **Avancement de la rédaction du rapport**

Les modifications et compléments apportés au rapport sont présentés et discutés.

- **La classification des souches STEC**

Les classifications des souches STEC proposées par l'Anses (2017) et le JEMRA (2018) ont été confrontées aux données de surveillance microbiologiques et épidémiologiques françaises (données du CNR) pour évaluer leurs caractères prédictifs des formes cliniques les plus graves (SHU ou diarrhées sanglantes). Une révision de la classification de l'avis de 2017 est proposée car celle-ci n'est pas en totale adéquation avec les données épidémiologiques françaises en particulier pour les groupes II et III.

Différentes propositions de classification sont présentées et comparées en termes :

- de valeur prédictive positive (VPP) (proportion de souches ayant causé une forme clinique) pour le SHU et la diarrhée sanglante (DS),

- de parts relatives de SHU ou de DS, en population générale, chez les enfants de moins de 15 ans et chez les adultes.

Après discussions, le critère retenu pour le classement est la capacité des souches à induire des formes sévères d'infection principalement le SHU (VPP SHU), puis la DS en cas d'équivalence.

Les souches STEC associées au risque le plus élevé de maladie et ayant le plus fort potentiel de provoquer un SHU possèdent les variants *stx2a* et/ou *stx2d* et les gènes ou marqueurs d'adhésion *eae* ou *aggR* (84% des cas de SHU et une VPP SHU de 69%).

Les sérogroupes ne sont pas inclus dans les critères de pathogénicité mais sont cités en note de bas de tableau, en particulier pour des raisons analytiques et d'épidémiologie.

Les points suivants ont été discutés :

- Le rang des souches *stx2a/2d+* *eae-* (groupe II) et autres *stx+*, *eae+* (groupe III) : les souches *eae* négatives possédant les variants *stx2a* et/ou *stx2d* ont été classées dans le groupe II, avant les souches *eae+* possédant les variants autres que *stx2a/2d*, car elles présentent une VPP SHU plus élevée. L'analyse séparée des populations enfants / adultes montre que les souches *stx2a/2d+* *eae-* représentent 1% des cas de SHU chez les enfants vs 22% des cas de SHU chez les adultes. Les autres sous-types de Stx sont moins fréquemment associés à des cas de SHU et sont retrouvés principalement dans les cas de diarrhée sanglante et de diarrhée aiguë.
- La capacité des méthodes existantes à détecter les groupes de souches tels que définis dans la classification.
- L'utilisation de la nouvelle classification par les gestionnaires du risque.

- Dénomination EHEC/STEC :

L'avis de l'Anses de 2017 indique que toute souche d'*E. coli* isolée chez l'Homme ou dans les aliments devrait être considérée comme une EHEC, si elle possède les gènes *stx1* et/ou *stx2* et *eae* ou d'autre(s) gène(s) codant un système d'adhésion au tube digestif de l'Homme.

Compte tenu de la proportion des souches *stx+* *eae-* dans les cas d'infections, il est proposé d'indiquer STEC pour les souches non cliniques et EHEC pour les souches isolées de cas humains. Par simplification, le terme STEC (qui inclut les EHEC) est utilisé dans le rapport.

- Séance du 15 février 2023

Le document d'analyse et les conclusions de l'expertise sont présentés en séance en vue de leur validation. Les conclusions et recommandations de l'expertise sont relues et reformulées en séance.

Conclusions de l'expertise collective

Le CES BIORISK émet les conclusions suivantes en réponse aux questions de la saisine.

Sur la base des données de santé publique disponibles, quels sont les déterminants de la virulence des souches de STEC ?

Toute souche d'*E. coli* possédant un gène codant les shigatoxines (*stx*) est dénommée STEC pour *E. coli* producteur de shigatoxines (« *shigatoxin-producing E. coli* », ou plus rigoureusement « *shigatoxin-encoding E. coli* »). Les EHEC correspondent à des STEC dont la virulence et la pathogénicité chez l'Homme sont avérées puisqu'elles sont responsables d'une manifestation clinique de type diarrhée, colite hémorragique pouvant s'aggraver en micro-angiopathie thrombotique (MAT), principalement le syndrome hémolytique et urémique (SHU), surtout chez le jeune enfant, le sujet âgé et/ou immunodéprimé.

Les shigatoxines (Stx), responsables de lésions intestinales, rénales et cérébrales, sont le facteur de pathogénicité majeur des STEC. Les Stx sont classées en deux grands types : Stx1 et Stx2. De très nombreux variants ou sous-types de Stx1 et Stx2 ont été décrits et plusieurs études ont montré

que certains sous-types (*Stx2a*, *Stx2d*) sont plus fréquemment associés à des formes sévères de l'infection telles que le SHU.

La seule présence d'un gène *stx* n'est pas suffisante pour causer une infection sévère. La colonisation préalable de la muqueuse intestinale est essentielle dans la physiopathologie des STEC. L'intimine codée par le gène *eae* (inclus dans l'îlot de pathogénicité LEE - *Locus of enterocyte effacement*) est le principal facteur de colonisation. En l'absence du LEE et donc du gène *eae*, d'autres facteurs de colonisation peuvent être impliqués dans l'adhésion des STEC à la muqueuse intestinale (par exemple les facteurs d'adhésion agrégative). Plusieurs autres facteurs de virulence semblent également intervenir dans le pouvoir pathogène des STEC dont des toxines (l'entérohémolysine et la cytotoxine subtilase) ou des protéases. Certains STEC comme ceux du sérotype O80:H2 ont acquis des facteurs de virulence extra-intestinaux leur permettant de provoquer des infections invasives (bactériémie).

Au-delà du profil de virulence de la souche, d'autres facteurs contribuent à la survenue de signes cliniques voire de formes sévères tels que la sensibilité des personnes exposées (ex : âge, comorbidités), la dysbiose intestinale, la prise d'antibiotiques et la dose de STEC ingérée.

L'importance relative des facteurs/marqueurs de virulence est confirmée par l'analyse des données microbiologiques et épidémiologiques françaises et européennes. En France, les caractéristiques des souches isolées de cas d'infections à STEC sont les suivantes :

- le gène *stx2* est retrouvé dans 82 % des cas d'infections et 95 % des cas de SHU ;
- le gène *eae* est retrouvé dans 80 % des cas d'infections et 90 % des cas de SHU ;
- les sous-types de *stx* les plus associés au SHU sont *stx2a* (58 %) et *stx2d* (31 %) ;
- trois profils de virulence totalisent plus de 80 % des SHU : *stx2a+ eae+*, *stx2d+ eae+* et *stx1a+ stx2a+ eae+* ;
- les sérogroupes du top 5 (O157, O26, O103, O145 et O11) et O80 représentent 80 % des cas de SHU en France ;
- s'agissant des souches ne possédant pas le gène *eae* :
 - le gène *stx2* est prépondérant (75 % des cas d'infections et 87 % des cas de SHU), en particulier les sous-types *stx2d* et *stx2a* ;
 - d'autres facteurs de virulence confirmés ou putatifs sont présents : les gènes codant la cytotoxine subtilase (*subA*) et les facteurs ou marqueurs d'adhésion *Saa* et *AggR* détectés respectivement dans 49 %, 16 % et 2 % de ces souches ;
 - elles sont retrouvées majoritairement dans les cas survenus chez des adultes (35 % des cas de SHU adulte contre 3 % chez les enfants de moins de 15 ans) ;
 - les sérogroupes les plus fréquemment retrouvés sont O146, O91 et O128.

Dans quelle mesure la prise en compte des sous-types du gène *stx* ou de tout autre facteur génétique permettrait-elle de rendre plus discriminante la typologie des souches de STEC proposée dans votre avis de mai 2017 au regard de leur niveau de pathogénicité ?

Sur la base des données épidémiologiques et microbiologiques françaises (2017-2021) et de la littérature internationale, le CES BIORISK propose une nouvelle classification des souches de STEC en fonction de leur potentiel de virulence. Cette classification tient compte de l'association des souches avec les formes sévères d'infection (principalement le SHU, puis la diarrhée sanglante). Les principales évolutions par rapport à classification de l'avis de l'Anses de 2017 sont les suivantes :

- le critère retenu pour le classement des souches est la valeur prédictive positive (VPP) du SHU puis la VPP de la diarrhée sanglante en cas d'équivalence ;
- le sous-type du gène *stx* est pris en compte dans la caractérisation de la virulence ;
- le sérotype n'est plus considéré comme un critère de virulence des souches.

Les données épidémiologiques françaises et internationales montrent une plus grande virulence des souches possédant les sous-types *stx2a* et/ou *stx2d*, en particulier en présence du gène d'adhésion *eae*. **Les souches de STEC possédant les sous-types *stx2a* ou *stx2d* (seul ou en combinaison) et les gènes ou marqueurs d'adhésion *eae* ou *aggR* (groupe I) présentent le plus fort potentiel de provoquer un SHU.** Les souches *eae*-négatives possédant les variants *stx2a* et/ou *stx2d* (groupe II) présentent également un fort potentiel de provoquer un SHU en particulier chez les adultes (22 % des cas de SHU adulte contre 1 % chez les enfants de moins de 15 ans). Les souches de STEC possédant d'autres sous-types du gène *stx* (groupes III et IV) sont moins fréquemment associées à des cas de SHU et sont retrouvées principalement dans les cas de diarrhée sanglante et de diarrhée.

Le sérotype n'est pas associé à la virulence et n'a pas été retenu comme un critère pour la classification des souches. L'information sur les sérotypes demeure toutefois utile dans le cadre de l'épidémiologie humaine et alimentaire. Par ailleurs, il existe des techniques de détection, dans les aliments, des souches responsables de la majorité des cas de SHU en France, telles que les souches du top 5. Ces souches se répartissent dans les groupes I et III.

Nouvelle classification des souches STEC en fonction de leur potentiel de virulence

Groupe	Gènes	VPP ¹ SHU	VPP ¹ diarrhée sanglante
I ²	(<i>stx2a</i> et/ou <i>stx2d</i>) ³ +, (<i>eae</i> ou <i>aaiC</i> / <i>aggR</i>)+	69 %	13 %
II ⁴	(<i>stx2a</i> et/ou <i>stx2d</i>) ³ +, (<i>eae</i> ou <i>aaiC</i> / <i>aggR</i>)-	48 %	25 %
III ²	Autres <i>stx</i> +, (<i>eae</i> ou <i>aaiC/aggR</i>)+	13 %	38 %
IV	Autres <i>stx</i> +, (<i>eae</i> ou <i>aaiC</i> / <i>aggR</i>)-	15 %	31 %

¹ VPP : valeur prédictive positive. Capacité des souches à induire une forme clinique

² Les sérotypes du top 5 et O80 représentent environ 80 % des cas de SHU, 67 % des cas de diarrhée sanglante et 61 % des cas de diarrhée aiguë

³ Variants *stx* seuls ou en combinaison

⁴ Ces souches sont majoritairement impliquées dans les cas de SHU adulte (en majorité les sérotypes O91, O171, O174 et O148)

Cette classification peut être utilisée pour la définition de mesures de gestion (surveillance, gestion des lots contaminés) correspondant au niveau de protection préalablement défini par les gestionnaires du risque.

Compte tenu des possibilités d'évolution des souches d'*E. coli*, des systèmes de surveillance et des outils de détection et de caractérisation génomique, la pertinence de cette classification mériterait d'être reconsidérée régulièrement. La prise en compte d'autres facteurs de virulence potentiels (adhésines, toxines) et une meilleure connaissance de la physiologie et de la dissémination des phages *Stx* pourraient permettre à terme d'affiner cette classification.

Recommandations

Les travaux d'expertise ont mis en évidence des incertitudes sur la caractérisation de la virulence des STEC et des besoins de connaissances. Le CES BIORISK émet des recommandations de travaux de recherche plus particulièrement les points suivants :

- prévalence des souches de STEC dans le microbiote intestinal des animaux et des humains sains et malades ;
- impact des mécanismes de régulation des phages Stx (répresseur, protéines de réplication) sur la production des shigatoxines et la virulence des souches ;
- facteurs d'induction du prophage codant les shigatoxines (ex : microbiote, antibiotiques, xénobiotiques, constituants des aliments) ;
- mécanisme de production, de sécrétion et de translocation de la shigatoxine ;
- analyse des souches de STEC *eae*-négatives associées à des formes cliniques sévères pour identifier les principaux facteurs de colonisation ;
- identification et caractérisation des facteurs de virulence, d'adaptation et de colonisation des STEC dans la chaîne alimentaire (environnement, animal, aliment, humain) ;
- impact des facteurs liés à l'hôte sur la survenue de l'infection.

Une meilleure exhaustivité des données de surveillance humaine permettrait de préciser la classification des souches de STEC en fonction de leur potentiel de virulence. Aussi, le CES BIORISK émet les recommandations suivantes concernant la surveillance des infections à STEC :

- En France,
 - recueil des informations cliniques associées aux prélèvements envoyés au CNR (comorbidités, traitement, etc.) ;
 - renforcement de la surveillance des cas de SHU adulte ;
 - extension de la surveillance des infections à STEC pour prendre en compte d'autres formes cliniques (p. ex. diarrhée sanglante).
- À l'échelle européenne,
 - harmonisation des systèmes de surveillance et standardisation du recueil de données épidémiologiques et cliniques ;
 - harmonisation des méthodes de caractérisation génomique des souches et partage des données de séquençage.

En outre, le CES BIORISK recommande de prendre en compte les sous-types *stx* dans la surveillance des denrées alimentaires. Par conséquent, le protocole analytique actuel (XP CEN ISO/TS 13136:2012) devrait être adapté pour rechercher, en fonction des sous-types *stx*, les souches de la classification proposée. Afin d'identifier les principales sources (réservoirs et aliments) des souches responsables de la majorité des cas humains en France, il apparaît également nécessaire :

- d'élargir la surveillance de la contamination par les STEC dans les principales filières alimentaires (animales et végétales) ;
- de séquencer les souches alimentaires et de les comparer aux souches isolées de cas cliniques ;
- d'harmoniser les systèmes de surveillance et standardiser le recueil de données à l'échelle européenne.

Enfin, le CES BIORISK rappelle l'importance d'une approche intégrée de prévention et de maîtrise des STEC tout au long de la chaîne alimentaire. Le consommateur est également un acteur de la

maîtrise du risque par le respect des bonnes pratiques d'hygiène, la cuisson des aliments et l'éviction de certains aliments par les populations sensibles. Aussi, il apparaît nécessaire de renforcer les actions de communication à destination des consommateurs sur les mesures de prévention des risques microbiologiques alimentaires

Le vote du point 3.1 est effectué l'après-midi. Le président vérifie que le quorum est atteint avec 24 experts sur 27 ne présentant pas de risques de conflits d'intérêts.

À l'issue des débats, le Président propose une étape formelle de validation avec délibération et vote. Il rappelle que chaque expert donne son avis et peut exprimer une position divergente. Les experts adoptent à l'unanimité (24 experts présents au moment de la délibération) les conclusions de l'expertise relative à la définition des souches pathogènes d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines.

M. Philippe FRAVALO
Président du CES BIORISK 2022-2026