

---

*Quatrième partie :*

*Discussion générale et  
perspectives*

## **1. Discussion générale des résultats**

Les souches entéropathogènes (EPEC) et entérohémorragiques (EHEC) ont en commun la production d'une lésion d'effacement des microvillosités des entérocytes et d'attachement intime à leur membrane cytoplasmique ainsi dénudée (lésions AE). Ces souches sont regroupées sous le nom « *E. coli* attachantes et effaçantes » (AEEC). La première étape de la production de la lésion AE et de la pathogénie des souches EPEC et EHEC, comme pour de très nombreuses souches bactériennes pathogènes, est celle de la colonisation intestinale grâce à des adhésines spécifiques (ou non) de l'hôte et du tissu. Pour les souches EPEC et EHEC, cette étape a été baptisée : adhérence initiale. Cette étape d'adhérence initiale est sans doute la plus importante en ce qui concerne la pathogénie de ces souches, ainsi que la protection par vaccination et représente probablement une base de leur spécificité d'hôte (Law *et al.*, 1994). Si la lésion AE (à savoir l'effacement des microvillosités des entérocytes et l'attachement intime de la bactérie à la membrane cytoplasmique) des souches EPEC et EHEC commence à être bien connue, il n'en est pas de même de la toute première étape à savoir l'adhérence initiale et la colonisation du tractus digestif. En effet les connaissances sur les structures bactériennes permettant l'accomplissement de l'adhérence initiale sont loin d'être complètes. Ces connaissances sont plus complètes pour les souches EPEC humaines, tandis que les souches EHEC humaines ainsi que les souches EPEC et EHEC bovines se caractérisent plutôt par l'absence de données précises concernant ces adhésines, bien que certains candidats aient été décrits dans le passé comme adhésines primaires. Mais aucune confirmation de leur rôle *in vivo* n'a été apportée à ce jour.

Notre but principal était de mettre en évidence les facteurs d'adhérence des souches EPEC et EHEC bovines et de confirmer leur rôle dans la colonisation intestinale et le pouvoir pathogène des souches EPEC et EHEC bovines. Dans une seconde étape, notre but était d'étudier des souches EHEC d'origine humaine et d'autres isolées d'aliments d'origine bovine pour déterminer la présence de structures de surface identiques.

Durant nos travaux, les méthodologies immunologique et génétique ont été privilégiées. Dans l'approche immunologique, il a été supposé que l'anticorps monoclonal 2F3 (Kerr *et al.*, 1999), qui reconnaît spécifiquement les souches EPEC et EHEC, d'origine humaine ou bovine, du sérotype O26, cible un antigène commun de la surface bactérienne, qui pourrait être une adhésine potentielle. Dans l'approche génétique, en partant des opérons codant pour des adhésines connues, des séquences homologues ont été recherchés parmi une collection

des souches EPEC et EHEC par hybridation sur colonies et/ou PCR. Ces tests génétiques ont aussi inclus pour comparaison des souches vérotoxigènes (VTEC), qui ne produisent pas la lésion AE, mais bien les vérocytotoxines.

### 1.1. Travail concernant l'étude de l'anticorps monoclonal 2F3

Kerr et al. (1999) ont produit un anticorps monoclonal à partir d'une souris immunisée avec des protéines de membrane externe solubilisées, extraites de la souche 4276 (*eae* et *stx<sub>1</sub>* positive) EHEC bovine de sérotype O26. Cet anticorps (2F3) a été décrit comme reconnaissant dans un test ELISA toutes les souches EPEC et EHEC de sérotype O26 et une partie de souches EPEC et EHEC de sérotype O111, mais pas les souches EPEC et EHEC d'autres sérotypes ou des souches non-EPEC et non-EHEC indifféremment du sérotype. De plus, cet anticorps a été décrit comme reconnaissant en immunoblot une protéine de surface d'approximativement 21 kDa pour la souche EHEC de sérotype O26 d'origine, mais pas pour une souche O26 non-EHEC non-EPEC. Le poids moléculaire de cette protéine et sa présence à la surface est compatible avec un fimbriae.

La stratégie choisie afin d'identifier et de décrire l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal 2F3 ainsi que sa base génétique a suivi deux approches : i) la purification et le microséquençage de la bande protéique de 21 kDa reconnue en Western blotting (données non publiées) ; ii) la création d'une banque génétique à partir d'ADN total de la souche 4276 EHEC de sérotype O26 ayant servi à l'obtention de l'anticorps et le criblage de cette banque soit par ELISA avec l'anticorps monoclonal 2F3, soit par des sondes génétiques oligonucléotidiques synthétiques d'après les résultats de microséquençage de la bande protéique reconnue en Western blotting (article #1).

La reproduction du Western blot décrit dans l'article de référence (Kerr *et al.*, 1999), afin de purifier et microséquencer la bande protéique de 21 kDa reconnue n'a jamais réussi durant nos travaux. En fait, au lieu de reconnaître une seule bande d'environ 21 kDa, l'anticorps monoclonal 2F3 reconnaissait un polymorphisme de longueurs semblable à un profil d'électrophorèse spécifique pour des lipopolysaccharides. Cet échec nous a poussé à réévaluer la spécificité de l'anticorps monoclonal 2F3 pour les souches EHEC et EPEC. Le réexamen des souches étudiées auparavant a permis la mise en évidence de la contamination des souches EPEC et EHEC de sérotype O111, identifié dans l'étude initiale comme étant positives dans le test ELISA avec l'anticorps monoclonal 2F3, par des souches EHEC ou EPEC de sérotype O26. De plus, l'examen d'une nouvelle collection de souches d'*E. coli*

appartenant au sérotype O26 (70 souches EHEC et EPEC et 7 souches non-EHEC et non-EPEC) et à d'autres sérotypes a permis de confirmer la spécificité de l'anticorps monoclonal 2F3 pour les souches EHEC et EPEC de ce sérotype. Il faut ajouter qu'une meilleure évaluation nécessiterait un plus grand nombre des souches de sérotype O26 non-EHEC et non-EPEC. Malheureusement ces dernières sont rarement isolées, probablement parce qu'elles sont présentes en faible proportion dans l'intestin.

Après le criblage par ELISA avec l'anticorps monoclonal 2F3 d'une banque de plus de 2000 clones (obtenue par la deuxième approche) un clone (IXD2) exprimant l'antigène reconnu par cet anticorps a été identifié. Le cosmide porté par le clone IXD2 contenait un fragment d'ADN, d'une longueur d'environ 30 kb, correspondant à la région comprise entre les gènes *gmd* (codant pour une GDP-D-manose déshydrogénase) et le gène *wcaF* (codant pour une acétyl transférase) d'un côté, et, de l'autre côté, avec le gène *ugd* (codant pour une UDP-glucose-6-déshydrogénase). Aussi bien dans le cas d'*E. coli* K12 que dans le cas d'*E. coli* O157 les gènes compris entre ces deux extrémités appartiennent à deux opérons : a) l'opéron qui code pour la synthèse d'acide colanique (qui est incomplet dans notre insert) b) l'opéron qui code pour la synthèse de l'antigène O (qui est complet dans notre insert) (Stevenson *et al.*, 1996).

Afin de pouvoir identifier le ou les gènes impliqués dans la synthèse de l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal 2F3, une expérience de mutagenèse par transposition *in vitro* a été effectuée avec le EZ::TN Kan-2 Tnp Transposome kit (Epicentre) sur le plasmide du clone positif IXD2.

Plusieurs mutants ont été ainsi obtenus et pour cinq d'entre eux l'ADN chromosomique bordant le transposon a été séquencé. Les cinq mutants étaient différents et dans les cinq cas le transposon a été inséré dans des gènes appartenant à l'opéron codant pour l'antigène O.

Etant donné qu'à ce moment l'organisation et la séquence de l'opéron codant pour l'antigène O de sérotype O26 n'était pas encore publiée, la position relative de l'insertion des transposons a été déterminée en comparaison avec les extrémités de l'opéron pour la synthèse de l'antigène O, représentés par les gènes *galF* et *gnd*. Pour cela, des PCR ont été réalisées en utilisant des amorces spécifiques pour les gènes *galF* ou *gnd* et des amorces spécifiques situées aux extrémités du transposon et la taille des différents produits d'amplification a été estimée sur un gel d'agarose. Les séquences obtenues ainsi que les estimations effectuées ont été en parfaite corrélation avec la séquence de l'opéron codant pour l'antigène O de sérotype O26 publiée par la suite (D'Souza *et al.*, 2002). En fait, chez deux

---

des mutants le transposon s'était inséré dans les gènes codant pour les transférases (*wbuA* et *wbuB*) responsable de l'assemblage des sucres primaires afin de former l'unité O caractéristique des sérogroupes. Dans les trois autres mutants le transposon s'était inséré dans le gène *fnl1*, un gène qui avec les gènes *fnl2* et *fnl3*, est fort probablement impliqué dans la biosynthèse du L-FucNAc.

Ces résultats nous ont amenés à vérifier la production d'un LPS *smooth* (contenant l'antigène O) ou *rough* (sans l'antigène O) en surface du clone IXD2 ainsi qu'en surface des mutants dérivés à partir de ce clone. Les résultats de sérotypage ainsi que de la coloration au crystal violet (coloration utilisé pour vérifier la production d'un LPS *smooth* ou *rough*) montrent que le clone IXD2 produit en sa surface un LPS *smooth*, et que tous les mutants dérivés à partir de ce clone produisent un LPS *rough*. Mais, le clone IXD2 ne produit cependant pas l'antigène O26 par un test ELISA avec un immunsérum anti O26 spécifique du commerce (n° cat. 355-7211, BioRad Laboratories). Ce résultat peut s'expliquer comme suit. La souche DH5 $\alpha$ , qui a servi come hôte pour la construction de la banque génomique (et donc, du clone IXD2), est en fait une souche naturellement *rough*. Ce caractère est la conséquence de la présence d'une insertion et d'une délétion dans l'opéron *rfb*, mais la complémentation en *trans* reste possible (Liu *et al.*, 1994). La souche DH5 $\alpha$  produit alors l'antigène O16. La complémentation de la mutation de *rfb* O16 de la souche DH5 $\alpha$  par le cosmide porteur d'un *rfb* O26 peut ainsi donner deux situations : i) soit l'existence d'une double de population de chaîne O (de sérotype O26 et de sérotype O16) qui formerait une mosaïque en surface de la bactérie ; ii) soit la production d'un antigène O hybride composés de sucres venant des deux opérons. Dans les deux cas, les tests de sérotypage par agglutination et ELISA peuvent être perturbés. Le fait que les 5 mutants obtenus à partir du clone IXD2 soient *rough* peut donc s'expliquer par l'insertion du transposon dans un gène de l'opéron *rfb* et la suppression de la complémentation.

Toujours est-il que ces résultats montrent clairement la liaison entre le caractère 2F3 et l'antigène O de séro groupe O26. De plus, le clonage par « long range PCR » de l'opéron O de la souche EHEC O26 4276, ainsi que de l'opéron O d'une souche non-AEEC T282 de séro groupe O26 confirment que l'opéron O26 de la souche EHEC 4276 contient l'information nécessaire pour la biosynthèse de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 2F3, tandis que l'opéron O26 d'une souche non-AEEC ne la contient pas.

En partant de ces observations, il était intéressant de comparer l'opéron codant pour l'antigène O26 d'une souche AEEC avec l'opéron codant pour l'antigène O26 d'une souche

non-AEEC, au niveau de leurs séquences génétiques. La séquence génétique de l'opéron codant pour l'antigène O26 d'une souche AEEC ayant été entre temps publiée (D'Souza *et al.*, 2002), il restait à séquencer l'opéron codant pour l'antigène O26 d'une souche non-AEEC. Pour cela, des amplicons ont été obtenus par PCR, et après séquençage, en utilisant des amorces spécifiques dérivées à partir de la séquence publiée de l'opéron *rfb* codant pour l'antigène O26 d'une souche AEEC.

Dans un premier temps, l'analyse s'est focalisée sur la taille des produits d'amplification obtenus afin d'identifier d'éventuelles différences entre la taille obtenue et la taille qui pourraient marquer des délétions ou des insertions. Une attention particulière a été accordée au dernier gène de l'opéron codant pour l'antigène O de sérotype O26, le gène *wbuC* (D'Souza *et al.*, 2002). En fait, dans la souche EHEC étudiée, ce gène a été décrit comme étant incomplet, mais montrant des homologies avec un gène codant pour un acétylglucoseamine. Une de nos hypothèses de départ était que ce gène est complet pour les souches non-AEEC de sérotype O26. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas confirmé cette hypothèse. La comparaison des séquences obtenues pour les souches non-AEEC de sérotype O26 avec les séquences publiées pour la souche EHEC de sérotype O26 a mis en évidence une seule différence dans le gène *fnl1* et, encore, dans une seule des souches non-AEEC étudiées. Dans la souche (T282), une délétion punctiforme (adénine) est présente en position 7593 de l'opéron (position 351 du gène). Cette délétion induit l'apparition d'un codon « stop ». Comme un nouveau codon « start » est présente en aval de la délétion, le gène *fnl1*, qui normalement a une longueur de 1035 pb (343 aa), a été fractionné en deux fragments de 366 pb (121 aa) respectivement 636 (211 aa).

Le gène *fnl1*, ensemble avec *fnl2* et *fnl3*, a des homologies avec d'autres gènes impliqués dans la synthèse du L-FucNAc (Jiang *et al.*, 2001), mais à ce jour il n'existe pas encore de confirmation de la cascade enzymatique, qui aboutisse à l'obtention de ce sucre. Ce qui rend très difficile l'évaluation du rôle du gène *fnl1* seul ou ensemble avec les gènes *fnl2* et *fnl3* dans la biosynthèse de l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal 2F3. De plus, cette délétion n'a pas été mise en évidence dans la seconde souche non-AEEC de sérotype O26 (T652) étudiée.

Afin de tenter à nouveau de préciser la relation entre les deux caractères, 2F3 et antigène O26, des mutations provoquant la perte du caractère 2F3 ont été réalisées dans une souche sauvage EHEC de sérotype O26 en utilisant le transposon mini-Tn10 (Herrero *et al.*, 1990). Après mutagénèse et criblage de la banque obtenue, les phénotypes suivants ont été identifiés et retenus pour des analyses visant à identifier le lieu d'insertion du transposon: a) 2F3 négatif

---

et LPS-O26 négatif (3 mutants) ; b) 2F3 négatif et LPS-O26 positif (2 mutants) ; c) 2F3 positif et LPS-O26 négatif (1 mutant). Les combinaisons phénotypiques obtenues indiquent clairement que le phénotype 2F3 et le phénotype *smooth/rough* sont deux phénotypes dissociables. Malgré nos efforts, les travaux de sous-clonage effectués afin d'identifier le(s) gène(s) interrompus par le transposon dans les mutants obtenus n'ont pas abouti.

En résumé, l'anticorps 2F3 est spécifique des souches EPEC et EHEC du sérotype O26 sans qu'il puisse faire la différence entre les souches d'origine humaine ou animale, notamment bovine. On sait maintenant que l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal 2F3 est situé sur l'antigène O des souches EPEC et EHEC du sérotype O26 et que les gènes nécessaires pour sa synthèse sont présents dans l'opéron codant pour l'antigène O des souches AEEC du sérotype O26, mais pas par l'opéron codant pour l'antigène O des souches non-AEEC du sérotype O26. Cependant, la comparaison entre la séquence de l'opéron pour l'antigène O des souches O26 non-AEEC avec celle de l'opéron pour l'antigène O des souches O26 AEEC n'a pas permis de mettre en évidence la différence entre les antigènes somatiques des souches EPEC et EHEC et des autres souches du sérotype O26. Il reste raisonnable de croire que cette différence est due : i) à un (des) gène(s) situé(s) ailleurs dans le génome en dehors de l'opéron codant pour l'antigène O ; ii) à des différences de transcription des gènes ; ou encore iii) à la conformation tri-dimensionnelle de l'antigène O en surface de la bactérie.

Comme l'hypothèse de départ était que l'anticorps monoclonal 2F3 reconnaît un facteur impliqué dans le processus d'adhérence initiale, il faut aussi discuter de l'implication de cet antigène dans l'adhérence. Des résultats montrent cependant sans équivoque que l'anticorps 2F3 n'inhibe pas l'adhésion des souches O26 aux cellules MDBK (Taminiau et Mainil, résultats non publiés).

*In fine* l'anticorps 2F3 représente donc un outil de diagnostic intéressant, mais non parfait, des souches EPEC et EHEC O26.

## 1.2. Travail concernant d'autres adhésines

Nombre de bactéries pathogènes produisent ou contiennent l'information génétique pour des adhésines fimbriaires de type I, II, et/ou IV. Nous nous sommes proposé de rechercher par des outils génétiques la présence de telles séquences dans les souches EPEC et EHEC bovines. Auparavant, des résultats négatifs avaient été obtenus dans une approche similaire utilisant des sondes génétiques dérivées de gènes codant pour les sous-unités majeures ou les

---

adhésines proprement dites (Mainil *et al.*, 1993), produites essentiellement par diverses souches pathogènes humaines. Ces résultats peuvent cependant s'expliquer par les conditions expérimentales des conditions d'hybridation (15% de non-homologie admises) et par la relative grande spécificité d'hôte des sous-unités fimbriaires et des adhésines proprement dites. Par contre, les autres gènes codant pour des protéines régulatrices, d'ancrage et sous-unités mineures, sont plus conservés entre pili d'une même famille, même présents dans des souches pathogènes pour différents hôtes. Cette approche a, par exemple, permis l'identification d'un nouveau variant, Afa-VIII, de la famille des adhésines afimbriaires de la famille Afa produit par les souches NTEC (Mainil *et al.*, 1997 ; Lalioui *et al.*, 1999). En conséquence nos travaux se sont focalisés sur la mise en évidence de tels gènes.

Les souches choisies au départ appartenaient aux sérogroupes O5, O26, O103, O111, O118, O145 et O157. Les souches AEEC appartenant à ces sérogroupes sont en effet régulièrement isolées de veaux diarrhéiques, de bovins asymptomatiques à l'abattoir, de denrées alimentaires d'origine animale et d'humains souffrant de colite hémorragique (Mainil et Daube, 2005).

Nous avons recherché dans notre collection de souches EPEC et EHEC bovines la présence de gènes codant (i) pour des adhésines putatives des souches EHEC humaines, telle que LifA, Iha, LpfA, BfpA et (ii) pour des adhésines fimbriaires et afimbriaires présentes chez d'autres catégories de souches d'*E. coli* pathogènes pour le bovin (ETEC et NTEC), incluant Afa8-D/E, CS31A et F17A.

Même si toutes les souches EPEC et EHEC bovines ainsi que les souches EHEC humaines étaient négatives pour la sonde BfpA, toutes les souches EPEC et EHEC bovines ainsi que les souches EHEC humaines appartenant au séro groupe O145 et O157 étaient positives pour la sonde LpfA (le gène *lpfA* codant aussi pour pili de type IV). Toutes les autres souches bovines et humaines appartenant aux autres sérogroupes (O5, O26, O103, O111 et O118) ne possédaient pas de telles séquences. Ces résultats sont intéressants car les souches O157 et O145 présentent le pathotype  $eae\gamma - tir\gamma$ , alors que les pathotypes des souches appartenant aux autres sérogroupes sont différents (China *et al.*, 1999 ; Goffaux *et al.*, 2001). Il semblerait donc que le gène *lpfA* soit associé non seulement à deux sérogroupes, mais surtout à un pathotype AEEC particulier. Il est aussi important de constater que ce gène est présent aussi bien dans les souches bovines que dans les souches humaines.

La plupart des souches EPEC ou EHEC bovines ou humaines possèdent une séquence homologue au gène *lifA*, sauf les souches des sérogroupes O157 et O145. Le rôle de la toxine

LifA dans l'adhérence est controversé puisqu'un mutant  $\Delta lifA$  de la souche EPEC humaine E2348/69 (O127:H6) est toujours capable de produire le phénotype d'adhérence localisée (Klapproth *et al.*, 2000).

Le gène *iha* est présent chez presque toutes les souches bovines et humaines du sérotype O157, ainsi que chez une majorité des souches des autres sérotypes. Deux exceptions doivent être notées : le gène est le plus souvent associé aux souches EHEC qu'aux souches EPEC et semble peu présent chez les souches EHEC humaines O103. Le produit du gène *iha* confère l'adhérence diffuse plutôt que l'adhérence localisée chez *E. coli* O157:H7 (Tarr *et al.*, 2000).

Dix souches EPEC bovines O26 sur les douze étaient positives pour la sonde ClpE (codant pour la protéine chaperon du fimbria CS31A). Les souches EHEC bovines et EPEC et EHEC humaines du même sérotype, ainsi que les souches des autres sérotypes, étaient par contre négatives pour cette sonde. Par contre toutes les souches étudiées étaient négatives pour la sonde ClpG (codant pour la sous-unité majeure de la fimbriae CS31A). Les études complémentaires sur trois des dix souches positives pour la sonde ClpE ont montré qu'elles sont porteuses d'un gène qui présente 85 % d'homologie avec le gène *clpE*, mais ce gène n'est pas transcrit selon nos résultats. De plus, il est possible que ces souches ne possèdent pas l'opéron *clp* complet puisque le gène *clpG*, codant pour la sous-unité majeure, n'est pas présent. Toutefois, il est également envisageable que *clpE* appartienne bien à un opéron complet dont la sous-unité majeure soit différente de ClpG. En effet, ces sous-unités montrent une grande hétérogénéité de séquence, ce qui rend les approches de détection par homologie hasardeuses (PCR et hybridation).

Toutes les souches EPEC et EHEC bovines et humaines étaient négatives pour les sondes Afa8-D, Afa8-E et F17A. Par contre, la recherche des gènes intervenant dans la biosynthèse d'adhésines de la famille Afa (Afa III, Afa VII, Afa VIII and F1845) parmi une collection des souches VTEC d'origine bovine de sérotype O8 et O20 a aussi permis la mise en évidence de deux souches VTEC de sérotype O8 qui possèdent les gènes *afa-8D/afa-8E* et qui expriment l'adhésine Afa 8E. Cependant, du au fait que le nombre des souches n'était pas très important et que certains souches VTEC de sérotype O8 étudiées étaient négatives pour les gènes *afa-8D/afa-8E*, il reste à élucider le rôle de cette adhésine dans le processus d'adhérence initiale des souches VTEC d'origine bovine de sérotype O8.

## **2. Conclusions et perspectives**

Malgré les efforts considérables et les nombreuses études effectuées afin de comprendre les mécanismes de virulence et la pathogénie des souches diarrhéogènes d'*E. coli* en générale, et des souches EPEC, EHEC et VTEC d'origine bovine en particulier, la seule observation toujours valable, est qu'il s'agit d'un phénomène complexe dans lequel plusieurs aspects restent à élucider. Au cours de nos travaux une série de progrès qui pourront aider à une meilleure compréhension des mécanismes de pathogénicité et de spécificité d'hôte des souches EPEC, EHEC et VTEC, ont cependant été réalisés.

Cependant l'objectif général du projet - la description de facteurs impliqués dans le processus d'adhérence initiale des souches EPEC, EHEC et VTEC bovines permettant la colonisation intestinale afin de pouvoir les diagnostiquer et les typer de manière spécifique, (puisque le typage via les autres propriétés <LEE, plasmide pO157, vérocytotoxines> n'est pas concluant) - n'a pas été atteint.

La base de la spécificité d'hôte(s) de certaines souches pathogènes d'*E. coli* peut s'expliquer par la présence des facteurs spécifiques impliqués dans le processus d'adhérence initiale de ces souches. Néanmoins, ce paradigme d'après laquelle la spécificité d'hôte et de tissu est liée à la production d'une adhésine spécifique n'a pas été confirmé par les observations et les découvertes de ces dernières années relatives au processus d'adhérence initiale des souches EPEC, EHEC et VTEC humaines et bovines. C'est pour cela que certains chercheurs considèrent que la spécificité d'hôte de certaines *E. coli* pathogènes pourrait s'expliquer par une adaptation de ces souches aux conditions environnementales ainsi que par les variants l'intimine, de la protéine Tir, ainsi que des protéines Esp qu'elles produisent (China *et al.*, 1999 ; Goffaux *et al.*, 2001).

Néanmoins, quelle que soit l'explication de la spécificité d'hôte de ces souches EHEC d'*E. coli*, les études menées afin d'arriver à cette explication doivent être aussi transposées dans des modèles *in vivo* sur un modèle expérimental approprié. Dans ce cadre il faut envisager la transposition de nos résultats dans un modèle animal comme par exemple, des études *in vivo* chez les veaux après inoculation par voie orale.