

Contrôle génétique de la résistance aux *Salmonellae* chez les ovins

F. LANTIER (1), F. PITEL (2), P. BERTHON (1), I. LANTIER (1), A. GAUTIER (1), R. BOIVIN (1), J.L. WEISBECKER (3), J.C. BRUNEL (3), D. FRANCOIS (4), J. GELLIN (2), J. VU TIEN KHANG (4), J.M. ELSESEN (4)

(1) INRA, Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly

(2) INRA, Laboratoire de Génétique cellulaire, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex

(3) INRA, Domaine de Bourges-La Sapinière, 18390 Osmoy

(4) INRA, Station d'Amélioration Génétique des Animaux domestiques, BP27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex

Chez les mammifères, le contrôle de la résistance/sensibilité aux salmonelloses est polygénique. Plusieurs gènes ont cependant été identifiés chez la souris. Parmi ceux-ci, le gène *Nramp* contrôle également l'étape précoce de la multiplication d'autres agents pathogènes intracellulaires tels que les *Mycobacteria* et les *Leishmania* (Vidal et al, 1995). Un équivalent du gène *Nramp* a été cloné chez le mouton. Son effet sur une infection par une souche vaccinale de *Salmonella abortusovis* fait l'objet d'une analyse familiale portant sur 30 familles comportant chacune 40 demi-frères de pères. Des agneaux d'environ 100 jours ont été vaccinés avec la souche *S. Abortusovis* Rv6 et leur sang, leur rate et leurs ganglions prélevés 10 jours plus tard lors de l'abattage afin de mesurer les niveaux de colonisation bactérienne de ces organes, le niveau de la réponse anticorps, et de les typer pour un certain nombre de marqueurs génétiques. L'héritabilité des différents critères retenus est de l'ordre de 0,2 à 0,4 et la plupart des corrélations génétiques sont hautement significatives, suggérant que certains gènes pourraient contrôler à la fois la réponse anticorps et la persistance de la souche vaccinale dans les ganglions. L'effet du gène NRAMP et l'identification des fragments de chromosomes qui sont impliqués dans le contrôle génétique de l'infection vaccinale sont en cours d'analyse à l'aide de marqueurs génétiques.

Genetic control of resistance to *Salmonellae* in sheep

F. LANTIER (1), F. PITEL (2), P. BERTHON (1), I. LANTIER (1), A. GAUTIER (1), R. BOIVIN (1), J.L. WEISBECKER (3), J.C. BRUNEL (3), D. FRANCOIS (4), J. GELLIN (2), J. VU TIEN KHANG (4), J.M. ELSESEN (4)

(1) INRA, Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly

In mammals, a number of host genes are controlling the evolution of the *Salmonellae* infectious process. Among them, the mouse *Nramp* gene also controls the early infectious step of other intracellular pathogens such as *Mycobacteria*, and *Leishmania*. (Vidal et al 1995). An equivalent of the mouse *Nramp* gene has been cloned in sheep. Its effect on a *Salmonella abortusovis* infection with a live vaccine is presently measured by means of a familial analysis performed on 30 sires families of 40 half-sibs. Lambs which were around 100 day old were vaccinated with the vaccinal *S. abortusovis* strain Rv6 and their blood, spleen and popliteal lymph nodes were sampled at slaughtering 10 days later for the measurement of bacterial colonization and antibody responses, and for their DNA typing. The heritabilities of the different host susceptibility criteria which have been retained are in the 0.2-0.4 order of magnitude and several of the genetic corelation are highly significant, suggesting that some genes might control both the antibody response and the bacterial persistency in lymph nodes. The NRAMP effect and the identification of the chromosomal fragments (QTL) which are involved in the genetic control of the vaccine survival in organs are currently analysed by means of genetic markers.

INTRODUCTION

Les salmonelles sont des bactéries intracellulaires facultatives responsables de nombreuses pathologies (fièvres typhoïdes, infections aiguës ou chroniques, syndromes respiratoires, avortements, entérites...) chez l'homme et les animaux. Elles représentent un problème mondial étant donné les pertes qu'elles provoquent chez les animaux domestiques et leur transmission possible à l'homme à partir de troupeaux infectés.

Chez les animaux domestiques les moyens de lutte dont nous disposons sont souvent insuffisants : les mesures d'hygiène ne sont pas toujours applicables, les vaccins vivants sont efficaces mais ne concernent qu'un nombre limité de sérotypes, les vaccins tués induisent une protection insuffisante. La sélection d'animaux résistants constituerait un moyen de lutte complémentaire, peu onéreux, et susceptible de limiter les pertes animales et la transmission à l'homme.

Chez la souris, le contrôle génétique de la résistance à l'infection salmonellique est polygénique. Plusieurs gènes contrôlant l'une ou l'autre des phases pathogéniques de l'infection ont été identifiés. Ainsi, la multiplication précoce des salmonelles dans la rate et le foie est contrôlée par un gène autosomal dominant localisé sur le chromosome 1, le gène *Ity* (Plant et Glynn, 1979).

Un gène candidat pour le gène *Ity*, le gène *Nramp* (Natural resistance-associated macrophage protein) a récemment été cloné chez la souris (Vidal et al., 1993 ; Barton et al., 1994) puis chez l'homme (Cellier et al., 1994). Il code pour une protéine transmembranaire du macrophage. Une mutation de ce gène a pu être associée au phénotype sensible de certaines lignées murines. Le gène *Nramp* contrôle également la résistance à *Leishmania donovani* et la résistance à différentes espèces de mycobactéries (Vidal et al., 1995), ce qui lui confère une valeur de modèle et un intérêt économique potentiel certain puisque il participe au contrôle de trois groupes d'agents pathogènes majeurs.

Notre démarche a consisté à démontrer la possibilité de transposer en partie les connaissances acquises chez la souris aux ruminants domestiques, en utilisant l'infection des ovins par *Salmonella abortus ovis* comme modèle. La mesure de l'effet du gène NRAMP et la recherche d'autres gènes impliqués dans le contrôle génétique de la résistance des ovins à l'infection par *Salmonella abortus ovis* font l'objet d'une expérimentation en cours.

1. CHOIX D'UN MODÈLE D'INFECTION

1.1. L'INFECTION À *SALMONELLA ABORTUSOVIS*

Chez les ovins, l'infection à *Salmonella abortus ovis* se manifeste essentiellement par des avortements et une mortalité néonatale élevée (Pardon et al., 1988). Afin de lutter contre cette maladie, un vaccin vivant a été mis au point au laboratoire et s'avère efficace sur le terrain (Pardon et al., 1990). Mais les ovins représentent un modèle pour les ruminants d'autant plus intéressant que, comme les caprins et les bovins, ils sont également sensibles à plusieurs sérotypes de salmonella et à d'autres bactéries intracellulaires susceptibles d'être contrôlées par le gène NRAMP (Mycobactéries...). De plus, *S. abortus ovis* offre l'avantage sur le plan expérimental de n'être pathogène ni pour l'homme ni pour les autres animaux domestiques.

1.2. VARIABILITÉ DE LA RÉSISTANCE À L'INFECTION PAR *S. ABORTUSOVIS*

Une infection expérimentale par *S. Abortus ovis* réalisée sur de jeunes agneaux issus de 7 races ovines a permis de mettre en évidence la conformité du schéma pathogénique observé avec celui que nous avons élaboré chez la souris. Un effet de la race sur la plupart des variables mesurées et une variabilité individuelle importante, équivalente à celle que l'on peut observer entre différentes lignées de souris consanguines, a été observée. Ces résultats suggèrent que nous pouvions raisonnablement envisager l'hypothèse d'un gène majeur contrôlant l'infection par *Salmonella* chez les ruminants domestiques (Lantier et al, 1990).

1.3. VARIABILITÉ DE LA RÉPONSE À LA VACCINATION

Chez les animaux domestiques, l'étude du contrôle génétique de la résistance à l'infection nécessite des effectifs importants. L'inoculation d'une souche virulente devant être réalisée dans le cadre de bâtiments protégés, les effectifs utilisables sont limités. L'utilisation d'un vaccin vivant à virulence atténuée permet de travailler sur des effectifs plus importants dans le cadre de troupeaux d'élevage.

Nous avons donc montré, dans un premier temps chez la souris, que la persistance d'une infection par la souche vaccinale *S. abortus ovis* Rv6 est également contrôlée par le gène *Ity* et qu'elle est corrélée avec une réponse immunitaire humorale et cellulaire plus intense (S. Bernard et al, 1992). Un modèle d'infection par la souche vaccinale *S. abortus ovis* Rv6 a donc été mis au point chez les ovins et appliqué à la comparaison de plusieurs races ovines. L'étude de la cinétique de l'infection dans les différents organes a montré qu'un effet de la race et une variabilité importante peuvent être observés 10 jours après l'injection par voie intraveineuse de la souche vaccinale, tant au niveau de la colonisation des organes (rate et ganglions), qu'au niveau de la réponse anticorps. Ces critères de mesures de la réponse à une vaccination ont été utilisés comme des prédicteurs potentiels de la résistance/sensibilité des ovins à l'infection salmonellique. Ils devront être validés par l'infection par une souche virulente d'animaux considérés comme sensibles ou résistants.

2. AVANCÉES EN GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE : UNE DÉMARCHÉ DE CARTOGRAPHIE COMPARÉE

2.1. MISE EN ÉVIDENCE DE LA CONSERVATION CHEZ LES OVINS DE LA RÉGION CHROMOSOMIQUE CORRESPONDANT AU GÈNE MURIN *ITY*.

L'utilisation d'hybrides somatiques hamster-mouton fournis par N. Saïdi-Mehtar (Université d'Oran, Algérie) a permis d'assigner sept gènes (CTLA4, FN1, INHA, TNP1, VIL1, PAX3 et CHRNG) de la région correspondant au gène murin *Ity* au même groupe de synténie chez les ovins (Tabet-Aoul et al, 1995). Ce groupe de synténie est également conservé chez la chèvre et les bovins (Solinas -Toldo et al, 1995 ; Montgomery et al, 1995, Eggen and Fries, 1994).

2.2. LOCALISATION DE LA RÉGION CONSERVÉE SUR LE CHROMOSOME 2 OVIN

L'amplification d'un fragment du gène TNP1 a été tentée à partir de chromosomes triés par cytométrie de flux (fournis par le laboratoire d'E. Tucker ; Cambridge, GB). Cette

réaction a révélé le fragment attendu sur l'échantillon correspondant au chromosome 2 ovin (Pitel et al, 1994), dont l'identité a été confirmée par "Chromosome painting". Cette assignation a été confirmée par l'hybridation *in situ* du gène NRAMP (cf infra) qui a été localisé dans la région q4.1-q4.2 du chromosome 2 (Pitel et al, 1995).

2.3. CLONAGE DU GÈNE NRAMP OVIN ET OBTENTION DE MARQUEURS POLYMORPHES

Un fragment de 2169 paires de bases de l'équivalent ovin du gène murin *Nramp* a été cloné (Pitel et al, 1995). L'examen de la séquence exonique de 361 paires de bases conduit à un taux d'homologie de 87% entre les espèces ovine et murine, ce qui confirme la grande conservation de ce gène. Toutefois nous ignorons encore si ce gène présente ou non un polymorphisme chez les ovins et s'il est impliqué dans la résistance des ovins à l'infection par *Salmonella*. Ces questions seront abordées grâce à l'expérimentation actuellement mise en place. Celle-ci nécessitant des marqueurs polymorphes les plus proches possibles du gène dont l'effet sera mesuré, la recherche de séquences microsatellites au voisinage du fragment cloné a été poursuivie en priorité. L'obtention de ce type de marqueurs est en effet plus rapide que la recherche d'éventuelles mutations causales dans la séquence codante du gène NRAMP. Deux séquences microsatellite OVINRA1 et OVINRA2 correspondant respectivement à des séquences TG répétées 23 ou 13 fois ont été clonées à partir d'un cosmide comportant le gène NRAMP, le marqueur OVINRA1 étant situé dans la région 3' non codante de ce gène. D'autres marqueurs polymorphes (le gène TNP1 et des microsatellites) plus éloignés du gène NRAMP, seront également testés.

3. MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE DE MESURE DE LA RÉPONSE À UNE VACCINATION PAR *S. ABORTUSOVIS*, SOUCHE RV6

3.1. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

3.1.1. Population animale disponible.

La population expérimentale retenue est le troupeau d'ovins de la souche synthétique INRA 401. Il s'agit d'une souche créée par le département de Génétique Animale en 1970 à partir des races Romanov et Berrichonne du Cher, à aptitudes très complémentaires. Au cours d'un sondage préliminaire les animaux INRA 401 ont montré une variabilité importante vis-à-vis de l'infection salmonellique et un polymorphisme pour plusieurs marqueurs d'un éventuel gène ITY.

3.1.2. Besoins en animaux expérimentaux .

Le protocole envisagé a été proposé dans un cadre plus général par Niemann, Sorensen et Robertson dès 1961, et formalisé par Soller et Genizi en 1978. L'existence d'un gène influençant la résistance à la salmonellose et qui serait localisé à proximité d'un marqueur génétique est testée en comparant cette résistance dans les deux groupes de descendants d'un même reproducteur se différenciant par l'allèle reçu de ce reproducteur au locus marqueur : si le gène existe, si le reproducteur est hétérozygote SR pour ce gène (S : sensible, R : résistant), si le locus correspondant est lié au locus marqueur pour lequel le reproducteur est également hétérozygote MN, et si M et R sont sur un chromosome, N et S sur l'autre chromosome, alors, les descendants ayant reçu

l'allèle marqueur M seront plus résistants et ceux ayant reçu l'allèle N plus sensibles. Cette observation sera d'autant plus nette que les effets différentiels des allèles R et S seront grands et les locus du gène de sensibilité et du marqueur proches. Une population expérimentale de 30 familles de 40 descendants a été créée, la puissance de ce dispositif pour détecter un gène dominant ayant un effet de 1 écart type dépassant 90 pourcent d'après nos simulations.

3.1.3 Mesures effectuées.

Des expérimentations préliminaires ont suggéré qu'une information maximale et non redondante entre les animaux pouvait être obtenue par l'observation des anticorps (isotypes IgG1 et IgM) à J7, et des niveaux d'infection dans la rate et les ganglions préscapulaires 10 jours après l'injection intraveineuse d'une dose de 10^8 *S. abortus ovis* souche vaccinale Rv6. Afin de permettre de mesurer simultanément des paramètres concernant la croissance des animaux, ceux-ci ont été vaccinés à poids constant, à un âge variant entre 90 et 130 jours. Le poids des animaux a en outre été mesuré avant la vaccination et avant l'abattage.

3.1.4 Traitements statistiques.

Le test de l'existence d'un gène de résistance lié à un des marqueurs génétiques sera effectué à l'aide de différentes méthodes statistiques aux propriétés complémentaires : test de l'effet marqueur intra-père par analyse de variance comme proposé par Soller et Genizi (1978), méthode rapide et robuste, méthode du maximum de vraisemblance de Le Roy et Elsen (1993), méthode puissante, moins robuste, et modèle multi marqueurs (Knott et al, 1995). La deuxième de ces méthodes permettra le cas échéant de tester l'existence d'un gène à effet important sur la résistance à la salmonellose, non lié aux marqueurs testés.

Les calculs des coefficients d'héritabilité et de corrélations génétiques (mesures de l'hérédité polygénique) ont été effectués à l'aide des programmes standards appropriés (bibliothèque SAS, logiciel VCE de E Groeneveld).

3.2. RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Dans l'ensemble, les effectifs prévus pour la production de 30 familles de 40 descendants demi-frères de père ont été respectés puisqu'un total de 1184 descendants ont été analysés.

3.2.1. Héritabilités et corrélations génétiques des caractères mesurés.

L'influence possible des facteurs de variations connus, dont la composante génétique, a été examinée par une analyse de la variance multivariable selon le modèle linéaire mixte :

$$Y = (\text{animal}) + (\text{sexe}) + (\text{mode de naissance}) + (\text{série}) + b_1(\text{âge à la vaccination}) + b_2(\text{poids à l'abattage}) + E$$

L'effet animal est un effet aléatoire dont la matrice de variance covariance est établie en remontant les pedigree sur 7 générations. Cet effet animal est significatif pour la plupart des variables (anticorps, infection des ganglions, variations de poids). Le tableau 1 donne les estimations des paramètres génétiques.

Les résultats suggèrent l'existence de mécanismes génétiques proches gouvernant la réponse en IgM et IgG1 ($r=0.52$), ainsi qu'une forte relation entre les critères de sensibilité et la variation de poids entre la vaccination et l'abattage.

Cette première analyse conforte l'hypothèse que la résistance à la salmonellose, mesurée par nos critères indirects,

possède une composante génétique additive. Nous ne pouvons donc notamment pas exclure qu'un polymorphisme en un ou plusieurs gènes majeurs affectant cette résistance existe dans cette population.

3.2.2. Informations apportées par les marqueurs.

Seuls les marqueurs proches de NRAMP sont actuellement étudiés. Les marqueurs testés jusqu'ici (OVINRA1, OVINRA2, TNP1) ne permettent de différencier l'origine grand-parentale des zones chromosomiques transmises par leur père aux descendants testés sur leur résistance à la salmonellose que pour 14 pères qui sont donc hétérozygotes en ces marqueurs. En utilisant la méthode linéaire de Soller et Genizi (1978), l'effet du marqueur intra-père est significatif chez 6 des familles testées (effet sur le nombre de bactéries dans la rate pour trois d'entre elles, $p < 0,061$, $p < 0,068$ et $p < 0,042$; sur le niveau d'infection générale -rate + ganglion- pour une quatrième, $p < 0,061$; sur les taux d'anticorps IgG1, $p < 0,028$, et IgM, $p < 0,070$, pour les deux dernières respectivement). Ces premiers résultats devront être confirmés par des analyses plus approfondies et, pour les plus clairs d'entre eux, vérifiés expérimentalement par des mesures de la réponse à l'inoculation de la souche virulente sur des effectifs complémentaires de descendants.

CONCLUSION

L'infection à *Salmonella* des ovins représente un modèle d'étude des interactions hôte-bactéries chez l'hôte naturel. Les *Salmonella* font partie de ces groupes bactériens dont le comportement *in vivo* résulte d'adaptations variées permettant leur survie intra-cellulaire, tels que les *Listeria*, les *Brucella*, ou les *Mycobactéria*. Ces pathologies bactériennes, dont certains prédisaient la disparition il y a une dizaine d'années, font aujourd'hui la «une» des journaux. Dans ce contexte, les modèles d'infection développés au Laboratoire de

Pathologie Infectieuse et Immunologie ont toute leur valeur en tant qu'outils d'analyse des interactions hôte-bactéries.

Les progrès réalisés en biologie moléculaire, mais aussi en pathologie expérimentale et en immunologie ont permis la mise en évidence chez la souris de plusieurs dizaines de gènes impliqués dans la résistance aux maladies infectieuses. Mais quelques uns d'entre eux seulement ont été clonés, illustrant les possibilités et les difficultés du clonage positionnel (ou génétique réverse), qui permet de remonter du phénotype au gène, puis à la protéine et à son mécanisme d'action. La conservation du gène NRAMP chez les animaux domestiques, notamment chez les ovins offre des perspectives nouvelles en matière de lutte contre les infections provoquées par des pathogènes intracellulaires mais dans une perspective plus générale, le développement des cartes génétiques de nos espèces domestiques après celles de l'homme et de la souris nous donne les moyens d'identifier quelques uns des gènes impliqués dans le contrôle de la résistance aux maladies. L'utilisation de méthodes de pathologie et de génétique comparées peut être prometteuse, comme le démontre la démarche de biologie moléculaire présentée ci-dessus. Mais étant donné leur intérêt scientifique et économique, il importe également de développer les méthodologies correspondantes chez les animaux domestiques ce que représente le protocole présenté qui demande cependant encore à être validé par l'infection expérimentale avec une souche virulente de salmonella.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement tout le personnel des installations expérimentales de Bourges «La Sapinière» et de Nouzilly qui ont rendu possible les expérimentations rapportées ici. Une grande partie de ce travail a été financé par l'AIP INRA «Gènes de résistance aux maladies des végétaux et des animaux».

Tableau 1
Héritabilités et corrélations génétiques entre caractères.

	Niveau général d'infection	Taux d'anticorps IgG1	Taux d'anticorps IgM	Variation de poids vaccination-abattage
Niveau d'infection	0,20	0,21	0,20	- 0,26
Taux d'anticorps IgG1		0,16	0,52	- 0,03
Taux d'anticorps IgM			0,33	- 0,38
Variation de poids				0,11

RÉFÉRENCES

- BERNARD S, GUILLOTEAU L, BUZONI-GATEL D, PEPIN M, BERNARD F, LANTIER I, LANTIER F, 1992. NATO Advanced Workshop «The Biology of Salmonella», Messine, 2-5 Mai 1992.
- CELLIER M, GOVONI G, VIDAL S, KWAN T, GROULX N, LIU J, SANCHES F, SKAMENE E, GROS P, 1994. *J. Exp. Med.*, 180, 1741-1752.
- EGGEN A, FRIES R, 1995. *Anim. Genet.*, 26, 215-236.
- KNOTT S, ELSEN JM, HALEY C, 1995. *Theor. Appl. Genet.*, sous presse.
- BARTON CH, WHITE JK, ROACH TIA, BLACKWELL JM, 1994. *J. Exp. Med.*, 179, 1683-1687.
- PARDON P, SANCHIS R, MARLY J, LANTIER F, PEPIN M, POPOFF M, 1988. *Ann. Rech. Vét.*, 19, 221-238.
- PARDON P, SANCHIS R, MARLY J, LANTIER F, GUILLOTEAU L, BUZONI-GATEL D, OSWALD IP, PEPIN M, KAEFFER B, BERTHON P, POPOFF MY., 1990. *Res. Microbiol.*, 141, 945-953.
- LANTIER F, VU TIEN J, OSWALD IP, BOUIX J, GUERIN G, N'GUYEN TC, GROS P, SHURR E, SKAMENE E, BOIVIN R, PEPIN M, PARDON P, 1990. *Ann. Rech. Vét.*, 21, 305-306.
- LE ROY P, ELSEN JM, 1993. *Theor. Appl. Genet.*, 90, 65-72.
- MALO D, HU J, SKAMENE E, SHURR E, 1994. *Animal Biotechnology*, 5(2), 173-182.
- MONTGOMERY GW, PENTY JM, HENRY HM, SIZE JA, LORD EA, DODDS KG, HILL DF, 1995. *ANIMAL GENETICS*, 26, 249-259.
- NIEMANN-SORENSEN A, ROBERTSON A. 1961. *Acta Agric. Scand.*, 11, 163-196.
- OSWALD I P, LANTIER F, MOUTIER R, BERTRAND MF, SKAMENE E, 1992. *Clinical and Experimental Immunology*, 87, 373-378.
- PITEL F, LANTIER I, TABET-AOUL K, SAIDI-MEHTAR N, ELSEN J. M, LANTIER F, GELLIN J, 1994. *Mamm. Genome*, 5, 390-392.
- PITEL F, LANTIER I, RICQUET J, LANNELUC I, TABET-AOUL K, SAIDI-MEHTAR N, LANTIER F, GELLIN J, 1994b. *Mamm. Genome*, 5, 834-835.
- PITEL F, CRIBIU E. P, YERLE M, LAHBIB-MANSAIS Y, LANNELUC I, LANTIER F, GELLIN J, 1995. *Cell. Genet.*, 1-2, 116-118.
- PITEL F, LANTIER I, GELLIN J, ELSEN JM, LANTIER F, 1995b. *Animal Genetics*, in press.
- PLANT J, GLYNN AA, 1979. *Clin Exp Immunol*, 37, 1-6.
- ROBERTSON A. 1959. *Biometrics*, 15, 219-226.
- SOLINAS -TOLDO S, LENGOUR C, FRIES R, 1995. *Genomics*, 27, 489-496
- SOLLER M, GENIZI A, 1978. *Biometrics*, 34, 47-55.
- TABET-AOUL K, PITEL F, LANTIER I, GROS P, SAIDI-MEHTAR, F LANTIER, 1992. *Animal genetics*, 23 (Sup 1), 96.
- VIDAL SM, MALO D, VOGAN K, SKAMENE E, GROS P, 1993. *Cell*, 73, 1-20.
- VIDAL SM, TREMBLAY ML, GOVONI G, GAUTHIER S, SEBASTIANI G, MALO D, SKAMENE E, OLIVIER M, JOTHY S, GROS P., 1995. *J. Exp. Med.*, 182, 655-666

