# Réponse immunitaire innée et adaptative du porc face au virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin

Elise Bordet

▶ **To cite this version:**

Elise Bordet. Réponse immunitaire innée et adaptative du porc face au virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin. Immunologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLA024 . tel-02426944

**HAL Id: tel-02426944**
**https://theses.hal.science/tel-02426944**

Submitted on 3 Jan 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université PARIS-SACLAY

NNT : 2018SACLA024

Thèse de doctorat

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

# Réponse immunitaire innée et adaptative du porc face aux virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech (Institut des sciences et industries du vivant
et de l'environnement)

École doctorale n°581 **agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)**
Spécialité de doctorat : Immunologie

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 16 octobre 2018, par

**Elise Bordet**

Composition du Jury :

| | |
|---|---|
| François Meurens<br>Professeur, ONIRIS (UMR 1300) | Président du jury |
| Marc Dalod<br>Directeur de Recherche, CIML (Inserm U1104) | Rapporteur |
| Benoit Favier<br>Chargé de Recherche, CEA (UMR 1184) | Rapporteur |
| Nicole Pavio<br>Directeur de Recherche, ANSES Maison Alfort (UMR 1161) | Examinateur |
| Elodie Segura<br>Chargé de Recherche, Institut Curie (Inserm U932) | Examinateur |
| Nicolas Bertho<br>Chargé de Recherche, INRA (INRA U0892) | Directeur de thèse |

# Remerciements

Je remercie sincèrement *Marc Dalod* et *Benoit Favier* de me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie grandement les membres de mon jury de soutenance de thèse, *François Meurens, Nicole Pavio* et *Elodie Segura* d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie les membres de mon comité de thèse pour leurs conseils et leur bienveillance durant ces 3 ans : *Thomas Baranek, Michel Chignard, François Lefèvre* et *François Meurens*.

Je remercie infiniment *Nicolas Bertho* d'avoir été mon directeur de thèse durant ces 3 ans. Merci de m'avoir transmis tes connaissances et ta passion pour la science avec patience et gentillesse. Je te remercie aussi de m'avoir laissé une grande latitude d'organisation et de réflexion ainsi que de m'avoir fait confiance. Cela m'a énormément aidé à progresser, à me remettre en question et à asseoir ma confiance dans le domaine scientifique. Je garde en mémoire tous nos voyages à Ploufragan, à Nouzilly et à Houdan pour nos expériences. Je pense que choisir cette thèse était la meilleure décision possible et je ne le regrette pas une seconde. Je te remercie de ta considération et pour toute la culture scientifique et non-scientifique que tu m'as transmise. Tu as su être toujours disponible et compréhensif. Je te souhaite de superbes nouvelles épopées scientifiques à Nantes.

Je remercie *Isabelle Schwartz-Cornil* pour l'exemple de rigueur, d'organisation et de dévotion que tu as été pour moi durant ces 3 années. Je te remercie pour le temps que tu as pris pour mon travail, pour tes conseils toujours très judicieux et pour l'organisation du consortium SAPHIR qui t'a donné beaucoup de fil à retordre. La participation à ce consortium a été une chance pour moi, cela a été une source d'ouverture d'esprit et une leçon d'organisation et de travail d'équipe. Je te remercie sincèrement pour le travail de transmission que tu as fait, pour l'ensemble des choses que tu m'as expliquées qu'elles soient scientifiques ou non. Je souhaite à V2I de nouvelles recherches toujours plus passionnantes et beaucoup de réussite. C'est une très belle équipe où tout le monde est traité d'égal à égal.

Je remercie *Edwige Bouguyon* pour l'immense aide qu'elle m'a apportée au quotidien. Je resterai toujours très touchée de ton investissement pour ce projet. Tu as été d'un soutien indubitable et ton implication a toujours été très importante. Je garde de très bons souvenirs de nos voyages, des heures au laboratoire et de tout le travail abattu ensemble. Je te souhaite le meilleur.

Je tiens à remercier *Sabine Riffault* pour toutes nos conversations, sa bonne humeur et pour ses conseils. Je remercie grandement *Delphyne Descamps* pour tous les moments passés ensemble, les discussions et ton envie de partager avec moi tes connaissances et ta passion.

Je remercie *Pauline Maisonnasse* pour ses conseils, son soutien et sa gentillesse. Je te remercie de m'avoir transmis ta thèse et d'avoir toujours été là lors de mes doutes.

Je remercie *Irina Vassileva* et *Alexandre Péry* de l'école doctorale ABIES pour leur implication et leur soutien. ABIES est une école doctorale exemplaire qui est dédiée à ses étudiants.

Je remercie l'ensemble des animaliers, des techniciens, des ingénieurs et des chercheurs des plateformes expérimentales de Jouy-en-Josas, Nouzilly et de Ploufragan pour leur aide afin d'obtenir des échantillons. Je remercie l'abattoir de Houdan et son directeur *Guy Harang* pour nous avoir permis de prélever des échantillons chez eux. Ce soutien nous a permis de réaliser de nombreuses expériences indispensables à ces travaux. Je remercie *Mickael Bourge* pour les dizaines d'heures passées ensemble face au trieur. Je te remercie pour ta patience et ta gentillesse.

Je remercie l'ensemble des personnes qui ont pris part à ce projet et qui ont investi du temps et de l'énergie pour sa réussite et sa finalisation. Je ne pourrais jamais lister tout le monde tant l'entraide et la bienveillance sont des *leitmotivs* à l'INRA, j'espère qu'ils se reconnaitront.

Je remercie mes anciens encadrants lors de mes études d'ingénieur pour leur soutien et leur partage du goût de la recherche. Particulièrement, *Giovanna*, *Marie* et *Gemma* de m'avoir encadré avec autant de gentillesse en Ecosse ainsi que *Jean-Marc* et *Sandrine* à Rennes pour leur soutien dans ma démarche de faire de la recherche.

Je remercie mes amis bourguignons, lyonnais, rennais et parisiens pour tous les moments partagés. La vie est un équilibre où le poids de l'amitié est prépondérant.

Je remercie ma famille. Il n'y a pas un pas qui ne soit fait sans une pensée pour vous à Cluny, à Tramayes, à Sainte-Cécile et à Dole. Je remercie particulièrement ma mère pour son soutien, son abnégation et pour tous les sacrifices faits pour moi dans le seul but de m'aider à réussir.

*« Avant, je ne savais pas que la beauté avait un sens. Je l'acceptais comme telle, comme une réalité sans rime ni raison. J'étais dans l'ignorance. A présent, je sais, ou plus exactement, je commence à savoir. Cette herbe me paraît beaucoup plus belle maintenant que je sais pourquoi elle est herbe, par quelle alchimie du soleil, de la pluie et de la terre elle est devenue ce qu'elle est »*

*Martin Eden* de Jack London

# Sommaire

*Remerciements* ..... *5*

*Liste des abréviations* ..... *10*

*Liste des figures* ..... *12*

*Liste des tableaux* ..... *13*

*Préambule* ..... *14*

*Introduction* ..... *17*

*Chapitre 1 - Un virus à la répartition mondiale* ..... *17*

**A. Un pathogène avec un fort impact sur l'industrie porcine** ..... **17**

1. La découverte du virus ..... 17
2. Les symptômes et l'impact économique pour la filière ..... 17
3. Une nouvelle classification ..... 18
4. L'épidémiologie du SDRPv ..... 20
5. L'apparition de nouvelles souches de SDRPv ..... 21
6. Les modes de transmission ..... 22
7. Les phases d'infection ..... 22

**B. Un virus à ARN en constante mutation** ..... **24**

1. La description des virions et du génome viral ..... 24
2. La synthèse des protéines virales ..... 25
3. Une réplication dans les macrophages ..... 27
4. Mécanismes d'entrée dans les macrophages ..... 28
5. Le tropisme cellulaire du virus ..... 30

*Chapitre 2 – Les cellules immunitaires impliquées dans la réponse face au SDRPv* ..... *33*

**A. Les macrophages** ..... **33**

1. La découverte des macrophages ..... 33
2. L'ontogénie des macrophages ..... 33
3. Des rôles variés selon le tissu et le stade de développement ..... 35
4. Les macrophages pulmonaires et ganglionnaires ..... 36

**B. Les cellules dendritiques** ..... **39**

1. La découverte des DC ..... 39
2. Les rôles des DC ..... 39
3. Nomenclature et sous-types ..... 40
4. La maturation des DC ..... 42
5. Les connaissances chez le porc ..... 43

**C. Les lymphocytes T** ..... **45**

1. L'ontogénie des lymphocytes T ..... 45
2. Les lymphocytes T chez le porc ..... 46

**D. Les lymphocytes B** ..... **48**

1. L'ontogénie des lymphocytes B ..... 48
2. La rencontre avec l'antigène ..... 48
3. La formation des centres germinatifs ..... 49
4. Les programmes de différenciation ..... 51
5. La production d'anticorps de haute affinité ..... 51

*Chapitre 3 – La Réponse immunitaire anti-SDRPv* ..... *53*

**A. La réponse innée** ..... **53**

1. Les lymphocytes Natural Killers ..... 53
2. Production d'interféron de type 1 ..... 55
3. Les interactions du SDRPv avec les DC et les macrophages ..... 57

**B. La Réponse adaptative ..... 59**

1. La réponse des lymphocytes T ..... 59
2. La réponse humorale ..... 62

**C. Immunosuppression ..... 63**

***Objectifs ..... 65***

***Papier n°1 : Les cellules dendritiques et les macrophages du lavage broncho-alvéolaire sont similaires à leurs homologues du tissu pulmonaire ..... 69***

Introduction des travaux ..... 69
Article : Plos One 2016 ..... 70
Discussion complémentaire ..... 77

***Papier n°2 : les AM-like correspondent aux Pulmonary Intravascular Macrophages et sont susceptibles à l'infection par le SDRPv ..... 79***

Introduction des travaux ..... 79
Article : Scientific Reports 2018 ..... 80
Discussion complémentaire ..... 91

***Papier n°3 : La souche Lena type 1.3 induit une activation des cDC1 et une polarisation vers une réponse Th1 sans infecter ces cellules ..... 95***

Introduction des travaux ..... 95
Article : Soumis dans Frontiers in Immunology ..... 96
Résultats supplémentaires : Identification de nouvelles cellules infectées ..... 131
Résultats supplémentaires : Transfert cellulaire in vivo ..... 132
Discussions complémentaires ..... 135

***Papier n°4 : Identification et interaction des macrophages et des lymphocytes B dans le ganglion de porc à l'état basal et lors d'une infection par le SDRPv ..... 138***

Introduction des travaux ..... 138
Article en cours de rédaction ..... 140
Discussion complémentaire ..... 173

***Discussion générale et perspectives ..... 177***

Interaction entre SDRPv et macrophages ..... 177
Interaction entre SDRPv et cellules dendritiques ..... 178
Réponse cellulaire ..... 180
Réponse humorale ..... 181

***Réferences ..... 184***

# Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| AM : | *Alveolar Macrophage* (macrophage alvéolaire) |
| BAL : | *BronchoAlveolar Lavage* (lavage broncho-alvéolaire) |
| BCG : | Bacille de Calmette Guérin |
| BCL-6 : | *B-cell lymphoma-6* |
| BCR : | *B Cell Receptor* (récepteur des lymphocytes B) |
| bmDC : | *bone-marrow Dendritic Cell* (cellule dendritique dérivé de la moëlle osseuse) |
| cDC : | *conventional Dendritic Cell* (cellule dendritique conventionnelle) |
| CDP : | *Common Dendritic cell Progenitor* (précurseur commun des cellules dendritiques) |
| CG : | Centre Germinatif |
| CLP : | Common Lymphoid Porgenitor (précurseur lymphocytaire commun) |
| CLR : | C-type Lectine |
| CMH : | Complexe Majeur d'Histocompatibilité |
| cMoP : | *common Monocyte Progenitor* (précurseur commun des monocytes) |
| CPA : | Cellules Présentatrices d'Antigènes |
| CR : | *Complement Receptor* (récepteur des molécules du complément) |
| DC : | *Dendritic Cell* (cellule dendritique) |
| DZ : | *Dark Zone* (Zone sombre) |
| fDC : | *follicular Dendritic Cell* (cellule dendritique folliculaire) |
| FL13 : | *Flanders 13 virus* |
| HEV : | *High Endothelial Venules* |
| HSC : | *Hematopoietic Stem Cell* (cellule souche hématopoïétique) |
| IDO : | Indoléamine 2,3-dioxygénase |
| IFN : | Interféron |
| IL : | Interleukine |
| IM : | *Interstitial Macrophage* (macrophage interstitiel) |
| IPP : | plaques de Peyer de l'iléon |
| ISG : | *interferon stimulated gene* |
| LB : | Lymphocytes B |
| LV : | *Lelystad virus* |
| LZ : | *Light Zone* (zone claire) |
| M1 ou M2 : | Macrophages de type 1 et 2 |
| MCM : | *Medullary Cord Macropha*ge (macrophage des cordons médullaires) |
| moDC : | *monocyte-derived Dendritic Cell* (cellule dendritique dérivée de monocyte) |

moMacro : *monocyte-derived Macrophage* (macrophage dérivé de monocyte)

NendoU : Nidovirus uridylate-specific endoribonuclease

NK : *Natural Killer*

NLR : *Nod-Like Receptor*

OIE : Organisation mondiale de la santé animale

ORF : *Open Reading Frame* (cadre ouvert de lecture)

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

pDC : *plasmacytoid Dendritic Cell* (cellule dendritique plasmacytoïde)

PIM : *Pulmonary Intravascular Macrophage* (macrophage intravasculaire pulmonaire)

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

PRRSV : *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (traduction française SDRPv)

RdRp : *RNA-dependant RNA polymerase*

RE : Reticulum Endoplasmique

RTC : *Replication-Transcription Complexe*

SCSM : *Subcapsular Sinus Macrophage* (macrophage du sinus sous-capsulaire)

SDRPv : Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin

TAP : *Transporter-Associated Antigen*

TCR : *T Cell Receptor* (récepteur des lymphocytes T)

Tfh : *T follicular helper lymphocyte* (lymphocyte T folliculaire auxiliaire)

Th : *T helper lymphocyte* (lymphocyte T auxiliaire)

TGEV : *swine Transmissible GastroEnteritis Virus*

TLR : *Toll-like Receptor*

TRS : *Transcription-Regulating Sequence*

# Liste des figures

Figure 1. Classification des souches de SDRPv. ..... 19

Figure 2. Répartition du SDRPv dans le monde. ..... 21

Figure 3. Observation des virions de SDRPv par cryo-microscopie électronique. ..... 24

Figure 4. Protéines structurales membranaires du SDRPv. ..... 25

Figure 5. Synthèse des protéines virales. ..... 26

Figure 6. Cycle de réplication du SDRPv. ..... 28

Figure 7. Entrée et libération du génome viral dans le cytoplasme des macrophages. ..... 29

Figure 8. Origine et différenciation des cellules dendritiques (DC) et des macrophages. ..... 35

Figure 9. Comparaison inter-espèces des DC. ..... 41

Figure 10. Voies d'apprêtement et de présentation des antigènes par les DC. ..... 43

Figure 11. Transport de l'antigène dans le ganglion de souris. ..... 49

Figure 12. Différenciation des lymphocytes B. ..... 50

Figure 13. Evolution des facteurs immunologiques après l'infection. ..... 55

# Liste des tableaux

Tableau 1. Souches de SDRPv utilisées dans ce manuscrit. ..... 20

Tableau 2. Caractéristiques des lymphocytes porcins. ..... 46

# Préambule

Le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRPv) est l'un des pathogènes les plus néfastes dans les élevages. Les symptômes suite à l'infection se caractérisent par des problèmes respiratoires et de reproduction. L'agent étiologique de ce syndrome est un virus à ARN positif découvert en 1991(Wensvoort et al., 1991). Aujourd'hui, le coût pour la Communauté Européenne de ce pathogène s'élève à 1,5 milliard d'euros par an (https://www.h2020-saphir.eu/).

L'apparition de nouvelles souches de SDRPv est très fréquente et peut être expliquée par un taux de mutation extrêmement élevé. En Europe, une dynamique d'apparition de nouvelles souches très virulentes semble se dessiner depuis une dizaine d'années. A l'Est, notamment en Biélorussie, certaines souches très virulentes sont apparues et peuvent mener à la mort des animaux infectés. Alors qu'en Europe Occidentale, les souches présentes sont peu virulentes mais favorisent les co-infections bactériennes. Cette répartition géographique en Europe souligne la nécessité d'une politique de gestion globale de ce pathogène au sein des pays membres de la Communauté Européenne.

Cette thèse commencée le 1er novembre 2015, s'est déroulée au sein de deux consortiums européens :

1) le projet Aniwha killeuPRRSV dirigé par Hans Nauwynck (Belgique) et orienté sur la compréhension des facteurs de virulence entre les souches européennes. Au sein de ce projet, nos objectifs sont de tester si le degré de virulence des souches européennes peut être relié à la permissivité à l'infection des cellules dendritiques. Il s'agit aussi d'identifier de nouvelles cibles cellulaires du virus dans le poumon et le ganglion de porc.

2) le projet Horizon 2020 *Strengthening Animal Production and Health through the Immune Response* (SAPHIR) qui vise à développer de nouvelles stratégies vaccinales pour les animaux d'élevage, afin de diminuer l'utilisation d'antibiotiques et qui est coordonné par Isabelle Schwartz-Cornil (France). Au sein de ce projet, notre objectif était d'étudier le rôle protecteur de la réponse cellulaire face à l'infection.

Les objectifs à long terme de ces travaux de recherche sont d'augmenter les connaissances fondamentales sur la réponse immunitaire du porc face au SDRPv, afin de

favoriser la création de vaccins innovants et efficaces. L'ensemble de ce manuscrit se focalise sur les souches européennes.

En premier lieu, une introduction bibliographique présente les connaissances de l'état de l'art nécessaires à la compréhension de nos travaux de recherche. En second lieu, les travaux réalisés seront présentés sous forme de publications. Chaque publication sera précédée d'un résumé en français et suivie d'une discussion complémentaire. Une discussion générale clôture ce manuscrit et contient des axes de réflexion sur les perspectives ouvertes par ce travail.

# Introduction

## Chapitre 1 - Un virus à la répartition mondiale

### A. Un pathogène avec un fort impact sur l'industrie porcine

#### 1. La découverte du virus

A la fin des années 1980, une épidémie caractérisée par des problèmes respiratoires et de reproduction se déclenche aux Etats-Unis d'Amérique dans des élevages porcins (Keffaber, 1989). L'origine de cette épidémie étant inconnue, l'expression « *Mystery swine disease* » est alors employée (Collins, 1991). Quelques années plus tard, des symptômes similaires apparaissent dans des élevages européens (Terpstra et al., 1991). L'Allemagne et les Pays-Bas sont les premiers touchés, avant une propagation au reste de l'Europe de l'Ouest (Wensvoort et al., 1991). En 1991, des recherches de grande ampleur permettent de révéler l'origine virale de ces symptômes. En Europe, le premier isolat fut nommé Lelystad Virus (LV) en référence à la ville néerlandaise où il avait été isolé (Wensvoort et al., 1991). Le premier isolat américain fut nommé VR-2332 (Collins et al., 1992; Benfield et al., 1992). La comparaison du génome des isolats des 2 continents révéla une origine commune malgré un haut degré de divergence (63% d'identité nucléotidique) (Allende et al., 1999). En anglais, le terme *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV) fut adopté en 1992 lors du premier congrès international dédié à ce pathogène. En français, le terme de virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (SDRPv) lui est consacré.

#### 2. Les symptômes et l'impact économique pour la filière

Les symptômes induits par le SDRPv varient grandement en fonction de l'âge des porcs et de la virulence de la souche. Dans les élevages touchés par les souches les plus virulentes, on note des problèmes respiratoires chez les porcelets, une augmentation des infections secondaires et du taux de mortalité. Chez les truies, les problèmes gestationnels apparaissent au cours du troisième trimestre de gestation. Il s'agit d'avortements et de problèmes de mortinatalité (revue (Pileri & Mateu, 2016)). Les souches peu virulentes induisent des symptômes plus faibles mais agissent comme cofacteurs favorisant des infections microbiennes. En 2012, une étude de Nieuwenheuis *et al.* a estimé à 126 euros par truie le coût de ce pathogène en Europe (Nieuwenhuis et al., 2012). Une étude de filière globale a estimé à 1,5 milliard d'euros le coût annuel de ce pathogène pour la Communauté Européenne (https://www.h2020-

saphir.eu/) classant ce pathogène comme le plus coûteux de l'industrie porcine.

## 3. Une nouvelle classification

Le SDRPv est un virus enveloppé à ARN simple brin positif appartenant à la famille des *Arteriviridae* (Conzelmann et al., 1993) et à l'ordre des *Nidovirales* (Cavanagh, 1997). Historiquement, la famille des *Arteriviridae* comprenait les virus de l'artérite virale équine, de la fièvre hémorragique du singe, le virus élévateur de la lactate déshydrogénase chez la souris et le SDRPv (Meulenberg et al., 1993). En 2016, une nouvelle classification est proposée sur la base des 11 nouveaux *Arterivirus* hautement divergents découverts chez divers primates non-humains, des rongeurs et des marsupiaux (Kuhn et al., 2016). Cette classification a abouti à la séparation du SDRPv en 2 espèces distinctes jusqu'alors considérées comme une espèce scindée en 2 génotypes : le génotype 1, pour les souches apparentées aux isolats européens et le génotype 2 apparentés aux isolats américains. Cette séparation reflète le haut degré de divergence entre les souches dites européennes et américaines. Dans la nouvelle classification proposée en 2016, le SDRPv est regroupé avec un virus murin au sein du genre *Rodartevirus*, abréviation de *Rodentia*, *Artiodactyla* et *Arterivirus* (Kuhn et al., 2016). Dans l'ensemble de ce manuscrit, l'espèce d'origine du SDRPv sera noté type 1 pour les souches apparentées à l'isolat européen Lelystad et type 2 pour les souches apparentées à l'isolat américain VR-2332.

Historiquement, la diversité génétique des souches de type 2 semblait plus importante que celle observée au sein du type 1 (Kapur et al., 1996; Meng et al., 1995; Suárez et al., 1996). Grâce aux travaux menés par Stadejek *et al.* sur les souches d'Europe de l'Est, cette idée fut réfutée. En effet, il s'est avéré que les isolats d'Europe de l'Est avaient un très fort taux de divergence et de diversité. Cette découverte a abouti à la subdivision des souches de type 1 en 4 sous-types (Figure 1) (Stadejek et al., 2002; Stadejek et al., 2006). Le sous-type 1, noté type 1.1, regroupe la majorité des souches européennes. Il contient notamment le virus Lelystad, premier isolat découvert en Europe. Le sous-type 2, noté type 1.2, est présent dans les pays de l'Est, comme la Russie ou la Lituanie. Le type 1.3 est aussi caractéristique de l'Europe de l'Est et contient des souches européennes hautement pathogènes telles que la souche Lena découverte en Biélorussie en 2007. Le type 1.4 est très rare et peu étudié (Stadejek et al., 2008; Stadejek et al., 2013). Il faut noter que la diversité au sein du type 2 étant plus faible, la subdivision en sous-types n'existe pas. Des classifications différentes de celle établie par Stadejek définissent des sous-ensembles : il s'agit de « clades » dans les sous-types de type 1 et de lignages pour le

type 2 (Shi et al., 2010).

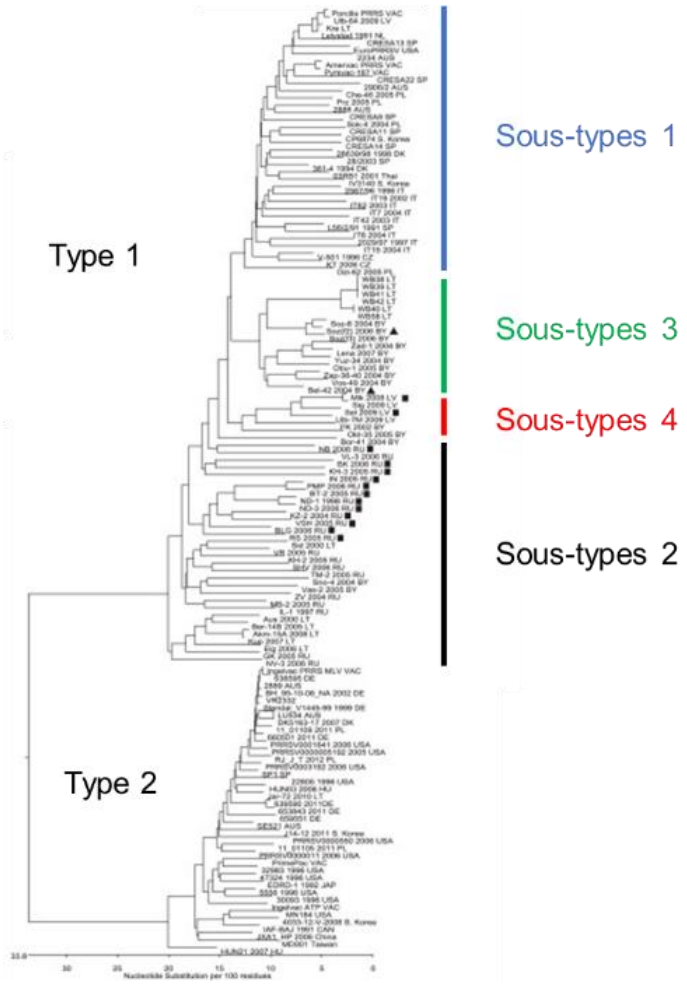



*Figure 1. Classification des souches de SDRPv.*
*Adaptée de Stadejek et al., 2013*

Historiquement, les souches virulentes appartenaient exclusivement au type 2. La découverte de souches virulentes au sein du type 1.3 a bouleversé ce dogme. Il s'agit des souches Lena et SU1-bel isolées en Biélorussie en 2007 et 2010 respectivement (Karniychuk et al., 2010; Morgan et al., 2013). Ces souches causent notamment de graves problèmes de reproduction chez les truies gestantes et peuvent engendrer jusqu'à 70% de mortalité chez les porcelets. L'ensemble de nos recherches se focalise sur les souches de type 1, prédominantes en Europe. Trois souches avec des degrés de virulence différents seront utilisées dans l'ensemble de nos expériences. Les caractéristiques de ces souches sont consignées dans le tableau 1. La souche Lena a été choisie pour son appartenance au type 1.3, et son haut degré de

virulence. La souche Lelystad qui possède une virulence faible à modérée a été choisie comme souche de référence du type 1.1. Par opposition, la souche émergente Flanders13 (FL13) appartenant aussi au type 1.1 a été sélectionnée en raison des symptômes cliniques plus importants qu'elle engendre (Frydas et al., 2015).

*Tableau 1. Souches de SDRPv utilisées dans ce manuscrit.*

| | Sous-type | Symptômes | Découverte | Lieu de découverte | Virulence | Sources |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Flanders13 (FL13) | 1.1 | Anorexie, fièvre et problèmes respiratoires | 2013 | Belgique | Moyenne | Frydas et al., 2015 |
| Lelystad (LV) | 1.1 | Problèmes respiratoires et de reproduction | 1991 | Pays-Bas | Faible | Weensvoort et al., 1991 |
| Lena | 1.3 | Haut degré de mortalité (jusqu'à 70% chez les porcelets), problèmes de reproduction (avortement et mortinatalité) et respiratoires | 2007 | Biélorussie | Forte | Karniychuk et al., 2010 |

## 4. L'épidémiologie du SDRPv

Malgré une répartition préférentielle des 2 espèces de SDRPv selon leur continent d'origine, les espèces cohabitent sur la plupart des continents. En effet, dès 1999 des souches de type 1 sont retrouvées aux États-Unis (Fang et al., 2004; Ropp et al., 2004), au Canada (Dewey et al., 2000), en Chine (Jiang et al., 2000), en Corée du Sud (Lee et al., 2010) et en Thaïlande (Thanawongnuwech et al., 2004). Au Danemark, des souches de type 2 ont été introduites à partir de 1995 *via* l'utilisation d'un vaccin atténué. En effet, les nouvelles souches découvertes partageaient plus de 98% d'homologie avec le vaccin (Bøtner et al., 1997; Madsen et al., 1998). Plusieurs vaccins contre le SDRPv sont commercialisés mais ont une faible efficacité face à des souches hétérologues. Certains pays restent indemnes de ce pathogène grâce à des politiques d'importation et des règles sanitaires très strictes. C'est le cas de l'Australie, la Suède, la Norvège et de la Finlande (Figure 2).

La recherche sur le SDPRv a connu un tournant en 2006 en Chine. Une épidémie

affectant 2 millions de porcs et causant la mort de 400 000 animaux s'est déclarée dans ce pays (Tian et al., 2007). Cette souche de type 2 fut dénommée SDRPv hautement pathogène (HP-SDRPv). Des études sur son origine ont montré qu'elle avait évolué à partir de souches peu pathogènes déjà présentes en Chine (An et al., 2011). Cette épidémie chinoise illustre parfaitement l'une des problématiques clé dans la gestion du SDRPv qui est l'apparition soudaine de nouvelles souches virulentes.

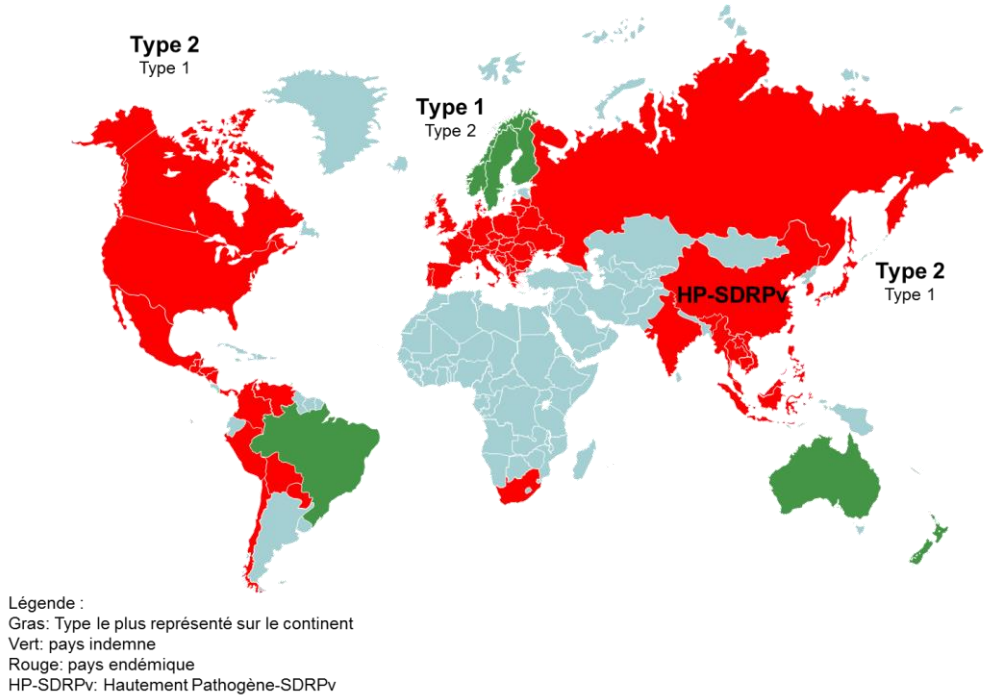



*Figure 2. Répartition du SDRPv dans le monde.*
*Selon l'organisation mondiale de la santé animale (OIE).*

## 5. L'apparition de nouvelles souches de SDRPv

Depuis la découverte du SDRPv, de nombreuses souches hautement pathogènes sont apparues. L'émergence de ces souches est favorisée par les mécanismes de réplication virale. Le taux de mutations aléatoires introduites lors de la réplication virale est très élevé (Forsberg et al., 2001) aboutissant à un taux d'évolution anormalement haut (Hanada et al., 2005). La diversité du SDRPv s'explique en partie par le taux d'erreur de l'ARN polymérase. Son taux de mutation est estimé à 1 nucléotide sur 10 000 (revue (Lauring & Andino, 2010)) aboutissant à la création de quasi-espèces, fréquemment décrites lors de la réplication du SDRPv (Rowland et al., 1999; Schommer & Kleiboeker, 2006; Zhao et al, 2012). De surcroit, chez les *Arterivirus*, cette enzyme nommée *RNA-dependent RNA polymérase* (RdRp), ne possède pas de

mécanismes de relecture de l'extrémité 3' de l'ARN synthétisé, ceci favorisant l'introduction de nouvelles mutations dans le génome (Lauber et al., 2013). Le mécanisme de recombinaison participe aussi à l'apparition de nouvelles souches. La recombinaison joue un rôle essentiel dans la réplication du SDRPv car elle est nécessaire à la formation des ARN subgénomiques (décrits plus loin dans ce manuscrit). De plus, si une cellule est infectée par deux souches de SDRPv, une recombinaison peut exister entre celles-ci (Conzelmann et al., 1993) (revue (Pasternak et al., 2006)).

## 6. Les modes de transmission

La transmission du virus peut se faire par contact direct entre individus ou par le biais d'un objet contaminé (Bierk et al., 2001). L'âge des individus est le facteur clé dans la transmission, les porcelets étant beaucoup plus sensibles à cette infection (van der Linden et al., 2003). Le virus peut se transmettre *via* les voies aériennes, les voies génitales, l'ingestion et les contacts notamment *via* des plaies ou des morsures (Hermann et al., 2005; Yoon et al., 1999). Lorsque le porc est infecté, le virus est présent dans de nombreux liquides excrétés tels que les sécrétions nasales, la salive, l'urine, les fèces, le colostrum, le lait et la semence (Wills et al., 1997; Swenson et al., 1994; Wagstrom et al., 2001). Une transmission verticale existe chez les truies gestantes majoritairement durant le dernier trimestre de gestation (Christianson et al., 1993). Il semblerait que les souches virulentes soient plus facilement transmissibles. Frydas *et al.*, ont montré qu'au sein du type 1, la souche Lena se répliquait plus fortement dans les muqueuses nasales que la souche Lelystad (Frydas et al., 2015) favorisant la formation d'aérosols.

## 7. Les phases d'infection

L'infection par le SDRPv est qualifiée d'infection persistante (revue (Lunney et al., 2016)).

L'infection présente 3 phases :

- La **phase aigüe :** Durant cette phase, le poumon est le site primaire d'infection. Le SDRPv se réplique dans le tractus respiratoire supérieur et le poumon. La réplication aboutit à la mise en place d'une virémie après 6 à 12 heures d'infection. Les virions sont libres dans le sang et cette virémie peut durer plusieurs semaines.
- La **phase de persistance :** La réplication persiste dans les organes lymphoïdes tels que les amygdales et les ganglions lymphatiques. Le titre viral diminue progressivement

dans le sang et le poumon. Les signes cliniques sont très atténués voire inexistants (revue (Pileri & Mateu, 2016)).

- La **phase d'extinction** correspond à un arrêt total de la réplication dans les organes lymphoïdes. Cette phase varie de 3 semaines à 3 mois post-infection. Néanmoins, certains individus ont montré une infection supérieure à 8 mois (Wills et al., 2003).

Il faut noter que bien que l'infection SDRPv ne perdure pas toute la vie de l'animal, elle peut persister durant plusieurs mois. Nous nous permettrons donc de qualifier cette infection de persistante puisque le terme est couramment utilisé dans les travaux sur le SDRPv (Lunney et al., 2016).

Les animaux sont donc capables d'éliminer le virus plus ou moins rapidement selon les individus et la souche virale. Néanmoins, les mécanismes de développement d'une immunité stérilisante n'ont pas été totalement découverts. Le rôle notamment des anticorps neutralisants n'est pas encore élucidé. Certaines études montrent que la virémie persiste même en présence d'anticorps neutralisants alors que parfois elle disparait avant l'apparition de ces anticorps (revue (Butler et al., 2014)). La réponse immunitaire du porc face au virus SDRPv sera développée dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

## B. Un virus à ARN en constante mutation

### 1. La description des virions et du génome viral

En 2012, une étude en cryotomographie électronique a dévoilé la structure des virions du SDRPv. Les virions ont une forme pléomorphique, variant de l'ovale à la sphère. La taille des virions est de 50 à 60 nm (Figure 3). Au centre des virions se trouve une nucléocapside de 40 nm séparée de la membrane lipidique qui l'entoure par un espace de 2 à 3 nm (Spilman et al., 2009).

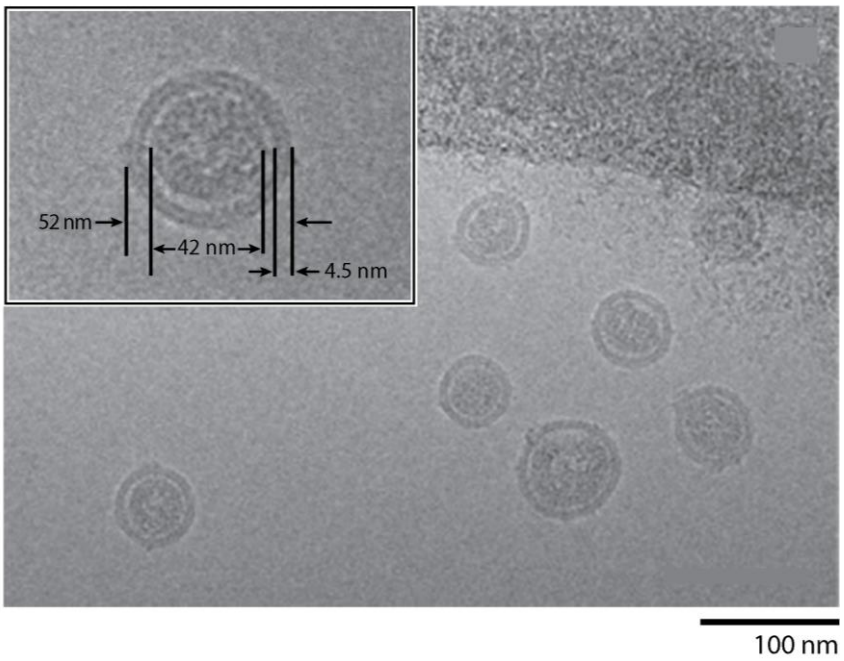



*Figure 3. Observation des virions de SDRPv par cryo-microscopie électronique. Selon Dokland et al., 2010.*

La nucléocapside est formée d'homodimères de la protéine virale N entourant le génome viral (Doan & Dokland, 2003). Des protéines structurales sont enchâssées dans la membrane lipidique. Les deux protéines GP5 et M sont les plus représentées et forment un hétérodimère *via* un pont di-sulfure (Verheije et al., 2002). La formation de cet hétérodimère est nécessaire pour assurer le potentiel infectieux des virions (Snijder et al., 2003). Les protéines GP2, GP3 et GP4 forment un complexe multimérique (Wissink et al., 2005). Das *et al.* ont montré l'importance de la glycosylation de ces protéines pour l'interaction avec les cellules (Figure 4) (Das et al., 2011). De plus, la protéine E semblerait faire partie de ce complexe (Wu et al., 2001;

Das et al., 2011). La protéine ORF5 découverte en 2011 est considérée comme la huitième protéine structurale (Firth et al., 2011; Johnson et al., 2011).

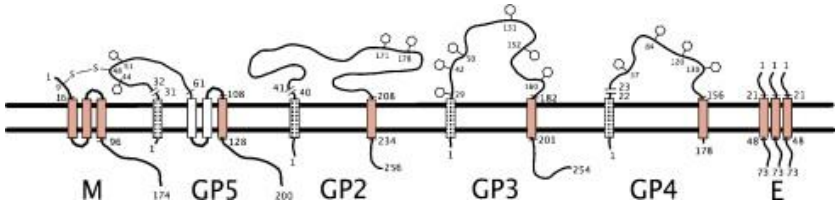



*Figure 4. Protéines structurales membranaires du SDRPv.*
*Selon Dokland et al., 2010.*

Le génome du SDRPv est constitué d'un brin d'ARN à polarité positive. Sa longueur varie entre 14,9 et 15,5 kilobases. Ce génome code pour des protéines structurales et non structurales grâce à deux mécanismes de transcription distincts. La synthèse des protéines non-structurales se fait par traduction directe du génome, alors que la synthèse des protéines structurales passe par une étape de synthèse d'ARN subgénomiques négatifs.

## 2. La synthèse des protéines virales

La synthèse des protéines non-structurales se fait *via* une traduction directe des cadres ouverts de lecture (*Open Reading Frame* ; ORF) : ORF1a et ORF1b. Ces derniers codent pour les polyprotéines pp1a et pp1ab respectivement (Figure 5). Les deux ORFs partagent le même site d'initiation de la traduction. La synthèse de pp1ab s'explique par la présence d'une séquence favorisant le décalage du cadre de lecture ribosomal sur la partie commune des deux ORFs (Meulenberg et al., 1993). Ce mécanisme de décalage se retrouve fréquemment dans les séquences virales et augmente le nombre de protéines pouvant être codées dans un génome de petite taille. La présence d'un autre site de décalage du cadre de lecture aboutit à la production de deux autres polyprotéines minoritaires nommées pp1a-nsp2TF (20% des cas, décalage de 2 nucléotides) et pp1a-nsp2N (7% des cas, décalage d'un nucléotide) (Meulenberg et al., 1993; Li et al., 2014). Il faut noter que pp1a-nsp2TF est obtenue grâce à un décalage du cadre de lecture de 2 nucléotides jusqu'alors inconnu pour les ribosomes des mammifères (Fang et al., 2012). Les 4 polyprotéines subissent des modifications co- et post-traductionnelles aboutissant à 16 protéines non structurales distinctes (revue (Ulferts & Ziebuhr, 2011; Kappes & Faaberg,

2015)). Parmi les protéines non structurales se trouvent les protéines nécessaires à la réplication. La machinerie réplicative est contenue dans la polyprotéine pp1ab. Cette machinerie forme le complexe de réplication et de transcription (*Replication/Transcription Complex ;* RTC) qui contient la *RNA-dependent RNA polymérase* (RdRp aussi appelée NSP9), une ARN hélicase et la *nidovirus uridylate-specific endoribonuclease* (NendoU) (van Dinten et al., 1996).

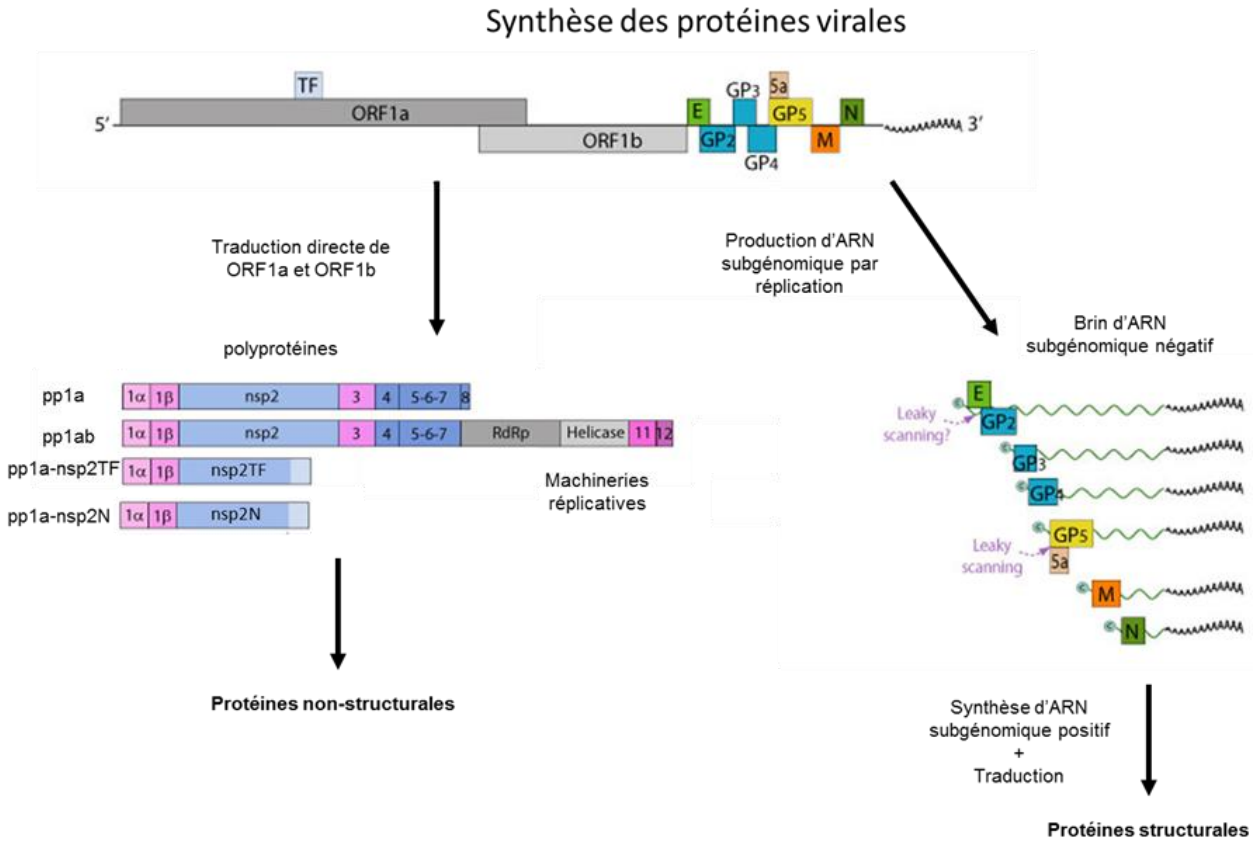



*Figure 5. Synthèse des protéines virales.*
*Adaptée du site internet « viralzone ».*
*(https://viralzone.expasy.org/28)*

La synthèse des protéines structurales nécessite une étape intermédiaire de synthèse d'ARN subgénomiques négatifs (Figure 5). Ces ARN sont synthétisés à partir du brin d'ARN génomique positif et servent ensuite de matrice pour la synthèse des brins d'ARN subgénomiques positifs. Ces derniers seront traduits par les ribosomes cellulaires en protéines structurales (revue (Kappes & Faaberg, 2015; Pasternak et al., 2006; Snijder et al., 2013).

Les ARN subgénomiques issus des ORF2 à 7 codent de une à 8 protéines structurales (Meulenberg et al., 1995). Le RTC réplique l'ARN dans le sens 3'- 5'. Le mécanisme à l'origine de l'arrêt de la réplication est une séquence *Transcription-Regulating Sequence* (TRS) présente à l'extrémité 5' de chacun des ORFs. Cette séquence peut former une interaction avec une séquence située à l'extrémité 3' du 5' UTR et arrêter la réplication, expliquant les tailles différentes d'ARN subgénomiques synthétisés à partir d'un même brin d'ARN positif (Meulenberg et al., 1993). Lorsque le RTC rencontre un TRS, deux possibilités existent : arrêter ou continuer la synthèse. Si la synthèse s'arrête cela aboutira à l'un des ARN subgénomiques. Dans le cas où la synthèse est complète, un brin complet négatif est synthétisé et servira de matrice pour la synthèse d'ARN génomique. Ce mode de synthèse commun aux membres de la famille des *Nidovirales* constitue en lui-même un mécanisme de recombinaison. Ce mécanisme est suggéré comme l'un des plus compliqués dans la réplication des virus à ARN positifs (revue (Gorbalenya et al., 2006)).

## 3. Une réplication dans les macrophages

Les cibles cellulaires principales du SDRPv sont les macrophages alvéolaires du poumon, du placenta et des tissus lymphoïdes. Par opposition, les cellules de la moelle osseuse et les monocytes du sang ont montré une résistance à l'infection (Duan et al., 1997a). En plus de l'état de différenciation, le niveau d'activation des macrophages joue un rôle clé dans leur susceptibilité (Duan et al., 1997b).

L'entrée du virus dans les macrophages se fait *via* deux récepteurs cellulaires primordiaux lors de l'infection. Les récepteurs CD163 et CD169 (aussi nommé sialoadhésine ou Siglec-1) participent à l'entrée et à la libération du virus dans le cytoplasme des macrophages. Dans les macrophages, l'entrée du virus est suivie d'une réplication virale (Figure 6) (revue (Van Breedam et al., 2010)).

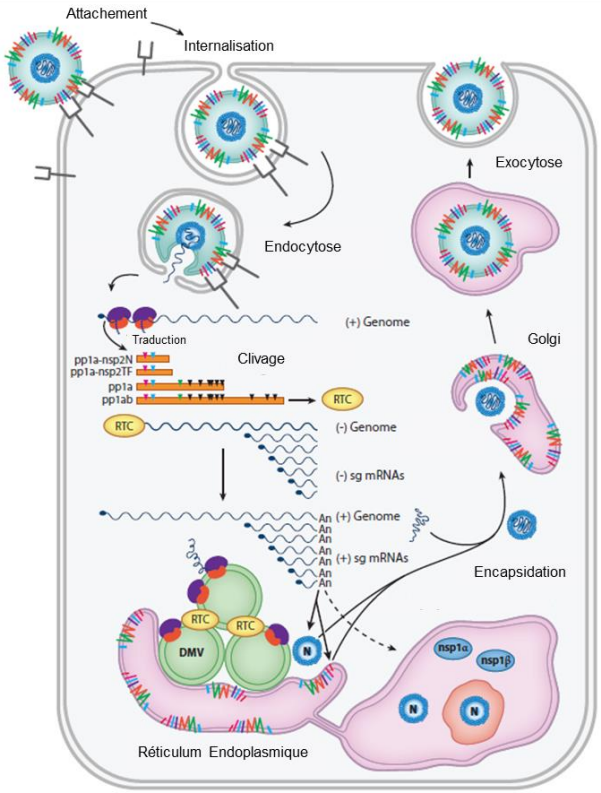



*Figure 6. Cycle de réplication du SDRPv.*
*Traduit de Lunney et al., 2016.*

## 4. Mécanismes d'entrée dans les macrophages

La concentration des virions à la membrane cellulaire se fait par fixation aux héparanes sulfates glycoaminoglycanes cellulaires (Delputte et al., 2005). L'internalisation se produit *via* des mécanismes d'endocytose après interaction entre l'hétérodimère M/GP5 et le récepteur cellulaire CD169 (Van Breedam et al., 2010). Une fois dans les endosomes précoces, l'interaction de la particule virale avec le récepteur CD163 se fait *via* les protéines virales GP2/GP4 (Das et al., 2010). Cette interaction participe au désassemblage et à la libération du génome viral dans le cytosol (Figure 7) (Van Gorp et al., 2009). Le récepteur CD163 joue un rôle essentiel dans la permissivité des cellules à l'infection. Ainsi, l'expression de CD163 dans des lignées cellulaires non-permissives les rend susceptibles à l'infection (Calvert et al., 2007). Des infections *in vivo* ont montré que les porcs CD163 KO ne présentent aucune virémie suite à une exposition avec les virus de type 1 et de type 2, soulignant le caractère indispensable de ce récepteur lors d'une infection (Wells et al., 2017). Par opposition, un tel résultat n'est pas

observé chez les porcs CD169 KO (Prather et al., 2013). De plus, il a été montré *ex vivo* que la souche Lena est capable d'infecter des cellules $CD163^{+}CD169^{-}$ du tractus respiratoire suggérant l'existence de récepteurs pouvant se substituer au récepteur CD169 dans les mécanismes d'entrée du virus (Frydas et al., 2013).

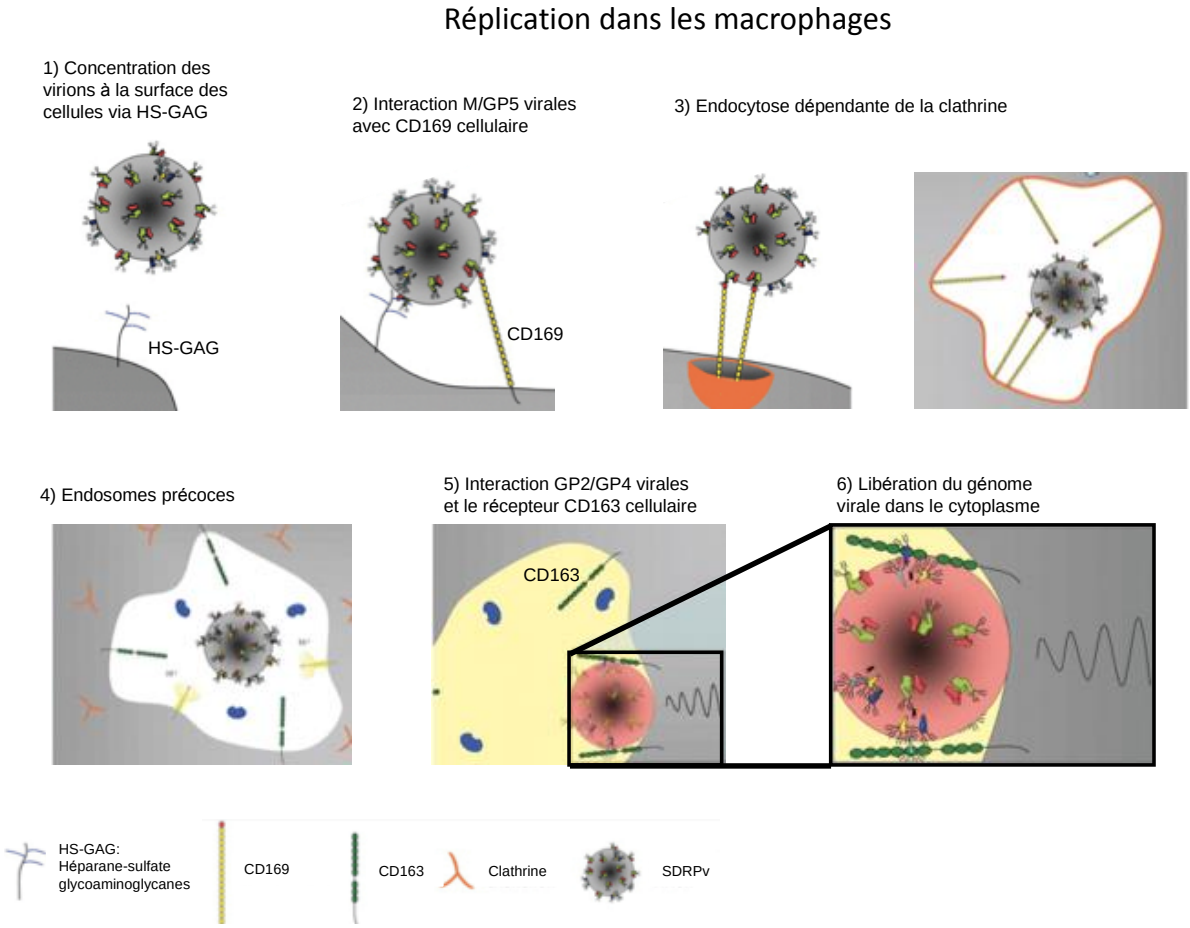



*Figure 7. Entrée et libération du génome viral dans le cytoplasme des macrophages. Adaptée de Van Breedam et al., 2010.*

Très récemment, de nouveaux récepteurs impliqués dans l'entrée du virus ont été découverts. En 2017, Siglec-10 a été identifié comme un nouveau récepteur impliqué dans l'entrée des souches de type 2. Ce récepteur peut se substituer à CD169 et non au récepteur CD163 (Xie et al., 2017). Dans la lignée cellulaire de référence MARC-145, le récepteur CD151 et la vimentine participent à l'infection (Shanmukhappa et al., 2007; Kim et al., 2006). La protéine virale E forme des canaux ioniques sur la membrane virale. Des fonctions dans la décapsidation et la libération du génome viral lui sont attribuées (Lee & Yoo, 2006). Certaines équipes proposent que les glycoprotéines des *Arterivirus* soient les éléments clés dans la

définition du tropisme cellulaire (Tian et al., 2012). Récemment, de nouveaux modes de transmission de cellule-à-cellule ont été identifiés *in vitro*. Ainsi, le virus serait capable de transmettre de l'ARN viral, des réplicases et des protéines structurales *via* des nanotubules intercellulaires (Guo et al., 2016). Une transmission intercellulaire *via* des exosomes (petites vésicules extracellulaires) a aussi été décrite en 2017 (Wang et al., 2017).

## 5. Le tropisme cellulaire du virus

La permissivité d'autres sous-types cellulaires distincts des macrophages a été étudiée. Les cellules de la moelle osseuse et les monocytes sont réfractaires à l'infection. Néanmoins, après culture *in vitro*, il a été montré que les monocytes peuvent être infectés à un faible niveau par le SDRPv (Duan et al., 1997a). Plusieurs études suggèrent que les DC porcines peuvent être infectées par le SDRPv. Néanmoins, de nombreux facteurs comme leur origine, leur état d'activation et les conditions de culture semblent impacter leur susceptibilité, aboutissant à des résultats contradictoires (Delputte et al., 2007). De plus, une différence semble exister entre les types 1 et 2 dans la susceptibilité des DC à l'infection.

Chez le porc, la plupart des études menées utilisent des DC différenciées *in vitro.* Ainsi, les protocoles d'obtention *in vitro* de DC à partir de précurseurs hématopoïétiques ou de monocytes du sang consistent à traiter ces cellules avec du FLT3 (Guzylack-Piriou et al., 2010) ou du GM-CSF/TNF-α (Carrasco et al., 2001) afin d'obtenir des *bone marrow-derived dendritic cells* (bmDC) ; ou du GM-CSF/IL-4 (Flores-Mendoza et al., 2008) afin d'obtenir des *monocyte-derived dendritic cell* (moDC) respectivement. Des infections de moDC et de bmDC obtenues *in vitro* sont fréquemment décrites avec le type 2 (Wang et al., 2007; Chang et al., 2008; Flores-Mendoza et al., 2008), alors qu'un tel résultat est moins clair avec le type 1 et semble dépendre de la souche utilisée (Silva-Campa et al., 2010).

Ces techniques *in vitro* donnent accès à un plus grand nombre de cellules que la collecte de DC primaires. Néanmoins, privées d'une différenciation *in situ*, ces cellules n'ont pas toujours le même comportement que les DC primaires. Après leur découverte, les DC ont majoritairement été étudiées *in vitro* grâce aux bmDC ou aux moDC obtenues après stimulation. Alors que l'existence des moDC *in vivo* a été démontrée (Cheong et al., 2010), les bmDC restent un modèle sans véritable équivalent *in vivo*. De plus, il a été montré chez la souris que les bmDC obtenues *in vitro* correspondaient à un mélange de cDC et de macrophages (Helft et al., 2015). Chez le porc, les moDC obtenues avec du GM-CSF/IL-4 sont souvent mal caractérisées dans

les publications et correspondent potentiellement à un mélange de cDC et de macrophages. Récemment, Singleton *et al.* ont produits et bien caractérisés *in vitro* des moDC et des macrophages dérivés de monocytes (moMacro) (Singleton et al., 2016). Les monocytes ont été cultivés avec du M-CSF ou du GM-CSF et de l'IL-4 afin d'obtenir des moMacro et moDC respectivement. Des expériences d'infection avec la souche Lena révèlent que les moMacro sont infectés par le virus alors que les moDC sont infectées à un très faible niveau (Singleton et al., 2016).

Pour conclure, des infections *in vitro* de moDC et de bmDC sont fréquemment observées avec les souches de type 2 alors qu'un tel résultat est plus rare pour les souches européennes. De plus, une variabilité existe au sein des souches de type 1 (Silva-Campa et al., 2010). Il semble donc que des expériences supplémentaires soit nécessaires afin d'élucider si les DC sont infectées par les souches européennes *in vivo*. Seules deux études ont tenté d'étudier l'infection de DC primaires isolées directement de poumons porcins. Malheureusement, ces dernières utilisent le marqueur CD11c comme marqueur spécifique des DC (Loving et al., 2007; Pröll et al., 2017) or une étude de mon groupe a montré que les macrophages porcins sont CD11c positifs (Deloizy et al., 2016) rendant ces résultats non interprétables.

Dans ce chapitre, il a été décrit que le SDRPv est un virus à ARN simple brin qui subit de forts taux de mutations aboutissant à l'apparition fréquente de nouvelles souches. En Europe de l'Est, des souches virulentes telles que la souche Lena sont apparues depuis une dizaine d'année. Malgré la variabilité des souches, l'ensemble de celles-ci infectent les macrophages *via* des interactions avec des récepteurs cellulaires. Quant à l'infection des DC, il n'y a pas de consensus dans le cas des infections de type 1. Il est évident que la capacité du SDRPv à infecter les cellules immunitaires telles que les macrophages et potentiellement les DC peut jouer un rôle primordial dans la mise en place de la réponse immunitaire face au virus. Dans nos travaux, nous avons décidé d'étudier les cellules immunitaires primaires du poumon et du ganglion de porc et plus particulièrement les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes pour tenter de faire avancer les connaissances sur la réponse immunitaire du porc face à l'infection SDRPv. Dans le chapitre suivant, nous développerons les connaissances existantes sur l'origine et les fonctions des cellules immunitaires impliquées dans la réponse face au SDRPv. Nous commencerons par décrire les connaissances sur les macrophages et les cellules dendritiques

puis nous décrirons les lymphocytes T et B.

# Chapitre 2 – Les cellules immunitaires impliquées dans la réponse face au SDRPv

## A. Les macrophages

### 1. La découverte des macrophages

Au 19ième siècle, Ilya Metchnikoff découvre les macrophages en utilisant une approche évolutive et ontogénique. Dans les années 60, van Furth *et al.* propose que tous les macrophages tissulaires dérivent des monocytes de la circulation sanguine (van Furth & Cohn, 1968). Ce dogme fera foi plus de 40 ans, jusqu'à la découverte d'une origine embryonnaire de la microglie formée par les macrophages du système nerveux central (Ginhoux et al., 2010). Ainsi, grâce à de nouvelles approches, il a été découvert que la plupart des lignées de macrophages résidents dans les tissus se mettent en place pendant le développement embryonnaire et persistent après la naissance de manière indépendante de la circulation sanguine (Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012; Yona et al., 2013; Hashimoto et al., 2013; Guilliams et al., 2013). Après la naissance, il existe donc des macrophages provenant de 2 origines : une origine embryonnaire et une origine hématopoïétique par différenciation des monocytes (Figure 8).

### 2. L'ontogénie des macrophages

Les macrophages d'origine embryonnaire se mettent en place lors du développement. Des précurseurs du sac vitellin ou du foie fœtal colonisent les tissus périphériques *via* la circulation sanguine. Dans le tissu, ces précurseurs se différencient en macrophages tissulaires et pourront s'auto-renouveler de manière indépendante de la circulation sanguine. Les macrophages embryonnaires ont des fonctions et des caractéristiques dépendantes de la niche tissulaire dans laquelle ils se trouvent (Schulz et al., 2012; Merad et al., 2002; Ginhoux et al., 2010; Hashimoto et al., 2013). Bien que tous les macrophages dérivent de précurseurs communs, l'environnement joue un rôle primordial dans la mise en place de leurs fonctions spécifiques au sein de chaque tissu (Gautier et al., 2012).

Les macrophages d'origine hématopoïétique se différencient à partir d'un précurseur monocytaire et sont appelés *monocyte-derived macrophages* (ou moMacro) (Fogg et al., 2006). Ainsi, les monocytes peuvent être attirés en grand nombre dans les tissus périphériques et se différencier selon leur environnement pro- ou anti-inflammatoire en moDC ou en moMacro (Bain et al., 2013). Dans ces conditions, les macrophages d'origines embryonnaire et

hématopoïétique coexistent dans le tissu. Dans certains organes comme le cœur, la peau ou l'intestin, les monocytes se différencient en moMacro de manière continuelle en absence d'inflammation (Bain et al., 2014; Molawi et al., 2014). Chez la souris, deux types de monocytes ont été décrits. Les monocytes classiques Ly6c$^{hi}$ rejoignent l'espace extravasculaire sous l'effet de CCL2, prennent en charge des antigènes et les transportent aux ganglions drainants en restant indifférenciés. En cas d'inflammation, ces monocytes se différencient en moMacro (Dal-Secco et al., 2015). Les monocytes non classiques Ly6c$^{low}$ patrouillent la paroi des vaisseaux sanguins, prennent en charge les cellules endothéliales endommagées et maintiennent l'intégrité du système vasculaire (Carlin et al., 2013). Cette subdivision des monocytes a aussi été observée chez l'Homme (Ingersoll et al., 2010). Une troisième population de monocytes dont la fonction n'est pas encore clairement définie a été identifiée chez la souris et l'Homme (Schmidl et al., 2014) (revue (Epelman et al., 2014; Ginhoux & Guilliams, 2016; Perdiguero & Geissmann, 2016)). Il faut noter qu'une subdivision supplémentaire existe dans les moMacro. Cette division se base sur les fonctionnalités des macrophages et définit des macrophages de type 1 (M1) et de type 2 (M2) induits par l'IFNγ et l'IL-4 respectivement (Martinez et al., 2013). Cette classification est très utilisée chez l'Homme et la souris mais une étude récente a montré qu'elle était discutable. En effet, le traitement *in vitro* de monocytes avec différents stimuli aboutit à des monocytes avec des caractéristiques à la fois M1 et M2 (Murray et al., 2014). Récemment, le concept d'un continuum entre les différents états d'activation des macrophages a été proposé (revue (Guilliams et al., 2015)) ainsi qu'une nouvelle classification basée sur 2 niveaux : l'origine cellulaire (embryonnaire ou hématopoïétique) et la fonction qui est associée à la localisation (Guilliams et al., 2013).

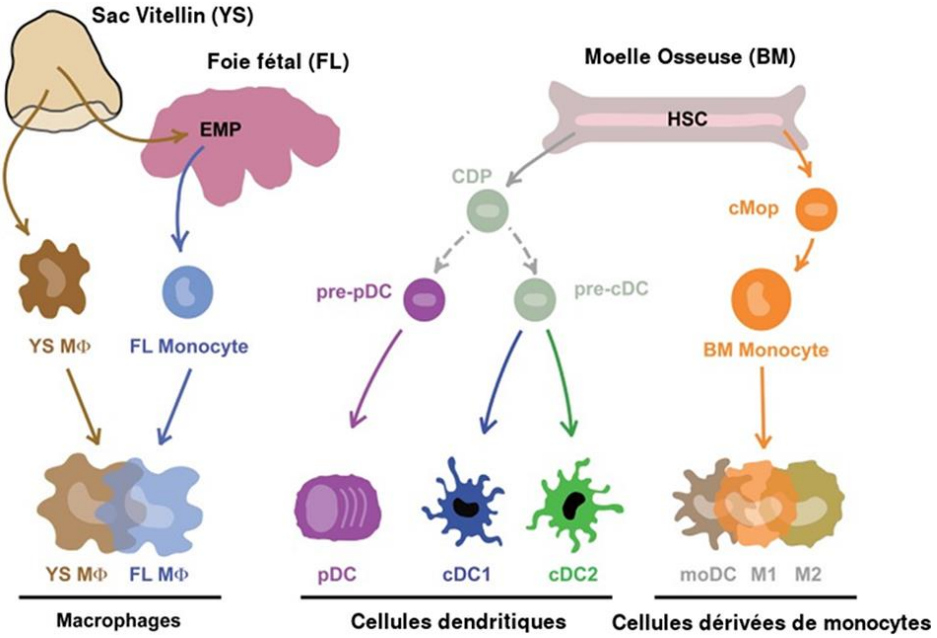



*Figure 8. Origine et différenciation des cellules dendritiques (DC) et des macrophages. Traduit de Guilliams & van der Laar, 2015.*

## 3. Des rôles variés selon le tissu et le stade de développement

Les macrophages peuvent avoir des rôles très variés selon le tissu et le stade de développement de l'individu. Lors de l'organogenèse, ils jouent un rôle primordial dans le remodelage des tissus, l'élimination des cellules sénescentes et l'angiogenèse (revue (Stefater et al., 2011)). Ainsi, chez le poisson zèbre, ils participent à la régulation de la pigmentation de la peau (Eom & Parichy, 2017). Chez la souris, ils participent au développement de la cornée (Liu et al., 2017), à la morphogenèse du rein (Rae et al., 2007), à la différenciation des spermatogonies (DeFalco et al., 2014), à la survie des neurones lors du développement du cerveau (Michaelson et al., 1996). Les fonctions principales des macrophages sont la phagocytose, la production de cytokines et dans une moindre mesure la présentation d'antigènes. Ils participent aussi à la réparation et à la régénération tissulaire (revue (Epelman et al., 2014; Nayak et al., 2014)).

Dans les paragraphes suivants, nous nous focaliserons sur les macrophages porcins du système respiratoire qui seront étudiés dans cette thèse. Il s'agit des macrophages alvéolaires (AM), des macrophages des ganglions trachéo-bronchiques et des macrophages alvéolaires-like (AM-like) du poumon décrits récemment par mon équipe.

## 4. Les macrophages pulmonaires et ganglionnaires

### *Les macrophages alvéolaires*

**Chez la souris**, il a été montré que les monocytes d'origine embryonnaire colonisent le poumon juste après la naissance et se différencient en macrophages alvéolaires (AM) (Guilliams et al., 2013; Yona et al., 2013). Cette différenciation est dépendante du GM-CSF et induit l'expression de PPAR-γ (Malur et al., 2011) qui contribue à la mise en place du profil d'expression des AM (Gautier et al., 2012). D'origine embryonnaire, les AM se renouvellent de manière indépendante des monocytes du sang. Néanmoins, en cas de déplétion importante des macrophages, une repopulation par les monocytes du sang peut avoir lieu (Hashimoto et al., 2013). Dans le poumon, les AM phagocytent les protéines du surfactant et l'absence d'AM provoque des protéinoses alvéolaires (Dranoff et al., 1994).

**Chez le porc**, les AM peuvent être identifiés par leur expression du CMH-II, de CD163, CD16 et Sirpα (McCullough et al., 1997; Ezquerra et al., 2009; Maisonnasse et al., 2016). La réponse des AM porcins à des stimuli est très proche de celle observée avec les AM humains (Fairbairn et al., 2011) (revue (Mair et al., 2014)). Ainsi, à l'instar des AM humains, une stimulation des AM porcins par du LPS mène à la production d'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) et des cytokines pro-inflammatoires TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, et IL-12. De plus, il a été montré que les AM porcins sont capables de stimuler la production d'IFNγ dans les lymphocytes T et NK (Fairbairn et al., 2011).

### *Les AM-like découverts chez le porc*

**Chez le porc**, mon équipe a décrit une population de macrophages pulmonaires possédant les mêmes marqueurs que les AM c'est-à-dire CMH-II, CD163 et Sirpα et n'exprimant pas l'équivalent porcin du marqueur CD11b nommé CD11R1 (Maisonnasse et al., 2016). Les auteurs ont prouvé que ces macrophages ne sont pas des AM contaminants du lavage broncho-alvéolaire et qu'ils sont différents des *Interstitial Macrophages* (IM) qui se trouvent entre l'épithélium alvéolaire et l'endothélium vasculaire. Dans le poumon de porc, les IM sont $CD163^{low}$ et dériveraient des monocytes du sang. Par conséquent ces cellules ont été nommées moMacro lors de leur découverte (Maisonnasse et al., 2016). Les IM ont aussi été décrits dans le poumon de souris (Bedoret et al., 2009). Les AM-like ont un profil transcriptomique identique à celui des AM. Les AM-like expriment les gènes HDAC10 et PU1 ; expriment

fortement CD64 et MerTK mais n'expriment pas CCR2 et CX3CR1 (Maisonnasse et al., 2016). De plus, ce profil est proche de celui décrit pour les macrophages embryonnaires chez la souris (Schulz et al., 2012). Dans les travaux de Maisonnasse *et al.*, les AM-like exprimaient MAFB de manière légèrement plus importante que les AM. Les AM-like pourraient correspondre à des cellules précédemment décrites et nommées *Pulmonary Intravascular Macrophages* (PIM). Les PIM sont attachés à la paroi interne des capillaires sanguins par des plaques d'adhésions intercellulaires (Thanawongnuwech et al., 2000) et leur taille varie de 20 à 80 µm (Schneberger et al., 2012). Seule la microscopie électronique permet de distinguer les IM des PIM, ces derniers ayant très rarement été isolés et étudiés. Chez le porc et le mouton, les PIM sont dits constitutifs et colonisent le poumon après la naissance (Schneberger et al., 2012), alors que chez d'autres espèces, les PIM apparaissent uniquement après une stimulation bactérienne. Chez l'Homme, peu d'études existent sur ces macrophages (Dehring & Wismar, 1989). Au niveau fonctionnel, les PIM sont très efficaces dans la phagocyctose des érythrocytes, de la fibrine et des débris cellulaires du sang et seraient plus pro-inflammatoires que les AM (Chitko-McKown et al., 1991).

### *Les macrophages du ganglion*

**Chez la souris**, les 3 types suivants de macrophages ganglionnaires ont été décrits : les macrophages du sinus sous-capsulaires (SCSM), les macrophages du sinus médullaires (MSM) et les macrophages des cordons médullaires (MCM). Les SCSM sont $CD169^+$, $CD11c^-$ et participent au transport des antigènes libres ou opsonisés du sinus vers le follicule B. Les MSM sont $CD169^+$ et sont localisés dans le sinus médullaire où la lymphe sort du ganglion. Les MCM sont $CD169^-$ et se trouvent dans les cordons médullaires où ils participent à la maturation des plasmocytes (revue (Gray & Cyster, 2012)). Les SCSM font partie des premières cellules du ganglion à être au contact des antigènes provenant de la circulation lymphatique. Des études *in vivo* chez la souris ont permis d'identifier leurs rôles. Les SCSM expriment les récepteurs CR3 (aussi appelé CD11b/CD18) et FcγRIIb qui permettent la fixation de complexes formés par des antigènes associés soit au complément soit à des IgG respectivement. Les SCSM peuvent aussi fixer les antigènes *via* des lectines comme CD169 ou MR. Il a été montré que les SCSM peuvent présenter et transférer l'antigène aux lymphocytes B naïfs (Carrasco & Batista, 2007; Junt et al., 2007). En situation inflammatoire, l'organisation des SCSM dans le ganglion est modifiée. Les SCSM migrent plus près du follicule et forment une couche de cellules plus fine (Gaya et

al., 2015). Dans le cas d'une infection grippale, une déplétion des SCSM par du chlodronate affecte de manière très marginale la production d'anticorps (Gonzalez et al., 2010) (revue (Heesters et al., 2016)). Chez la plupart des mammifères, la circulation lymphatique dans les ganglions est centripète (de l'extérieur vers l'intérieur). Ainsi, les vaisseaux lymphatiques afférents se déversent dans le sinus sous-capsulaire situé en périphérie du ganglion. Dans ce sinus se trouvent les SCSM qui participeront au transfert et à la présentation des antigènes. La sortie des lymphocytes matures se fait *via* le sinus médullaire et le vaisseau lymphatique efférent dont l'origine se trouve au centre du ganglion (revue (Phan et al., 2009)). En plus de ces 3 types de macrophages, une dernière population a été décrite durant nos recherches (Baratin et al., 2017). Ces macrophages présents dans la zone T (*T cell zone macrophage* ; TZM) phagocytent les corps apoptotiques. Chez la souris, les TZM peuvent être caractérisés par leur profil $MerTK^{+}/CX3CR1^{+}/CD169^{-}/CD163^{-}$.

**Chez le porc**, l'organisation du ganglion est inversée. La lymphe provenant des tissus périphériques se déverse dans un hilum central et percole vers l'extérieur du ganglion jusqu'à atteindre la capsule périphérique et les vaisseaux efférents (McFarlin et al., 1973). Les follicules B sont situés vers le centre du ganglion. Cette organisation centrifuge est partagée avec des membres de la famille des Laurasiathériens, tels que le rhinocéros, le dauphin et l'hippopotame (Pastoret et al.,1998). Comme pour les autres mammifères, les lymphocytes naïfs entrent dans le ganglion de porc grâce aux vaisseaux sanguins nommés *high endothelial venules* (HEV). Après maturation et activation, les lymphocytes porcins sortent du ganglion directement dans la circulation sanguine et non par la lymphe efférente. Les vaisseaux lymphatiques efférents participent donc à l'évacuation de la lymphe qui contient peu de lymphocytes. Chez le porc, les fonctions des macrophages ganglionnaires ont été étudiées dans un article en 2014. Malheureusement, l'ensemble des macrophages $CD169^{+}$ ont été étudiés sans distinguer les différents sous-types. Dans ces travaux, ces macrophages ont de bonnes capacités de phagocytose et de présentation d'antigènes (Alvarez et al., 2014). Concernant l'infection par le SDRPv peu de travaux décrivent de manière précise la localisation du virus dans le ganglion. Cependant, en 2015, une première étude sur les ganglions du tractus respiratoire a prouvé que lors d'une infection par un SDRPv de type 1, le virus était détecté dans l'espace folliculaire et inter-folliculaire (García-Nicolás et al., 2015).

## B. Les cellules dendritiques

### 1. La découverte des DC

Les DC ont été découvertes dans les organes lymphoïdes secondaires de souris (la rate, les ganglions et les plaques de Peyer). Ces cellules ont une morphologie qui rappelle les dendrites des neurones. Leur représentation est faible dans ces organes (0,1 à 1,6% des cellules nucléées) (Steinman & Cohn, 1973). A la fin des années 70, les capacités présentatrices d'antigènes des DC ont été découvertes grâce à des expériences de *Mixed Leucocytes Reaction* (MLR) où les DC de la rate de souris sont mises en culture *in vitro* avec des Lymphocytes T naïfs allogéniques. Ces expériences ont révélé la capacité des DC à induire une forte prolifération des lymphocytes T naïfs (Steinman & Witmer, 1978).

### 2. Les rôles des DC

Les DC sont des cellules immunitaires d'origine hématopoïétique présentes dans les organes lymphoïdes et les tissus périphériques. Leur fréquence est variable selon l'organe étudié et l'espèce. Lors d'une infection et selon les conditions d'inflammation, les DC présentes sur le site d'infection détectent le pathogène *via* des récepteurs spécifiques, maturent et peuvent migrer du tissu périphérique aux ganglions lymphatiques. Cette migration permet le transport et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T naïfs du ganglion et l'induction de la réponse immunitaire adaptative. Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) capables d'effectuer une présentation croisée. Cette présentation leur permet de présenter des antigènes endocytés aux lymphocytes T $CD8^+$. Les DC jouent aussi un rôle dans l'induction de la tolérance au soi en migrant à l'état basal (revue (Merad et al., 2013; Summerfield & McCullough, 2009; Stockwin et al., 2000)). Néanmoins, dans certains organes comme le thymus, il est possible que les DC participent à l'induction de la tolérance centrale en maturant localement sans phénomène de migration (revue (Domogalla et al., 2017)).

Dans les ganglions, il existe des cellules nommées cellules dendritiques folliculaires (fDC). Ces cellules d'origine mésenchymateuse n'ont aucun lien ontogénique avec les autres DC car ce ne sont pas des cellules hématopoïétiques. Ces cellules situées dans le ganglion sont impliquées dans la sélection et la maturation des lymphocytes B de haute affinité. Leur rôle et leur morphologie ont abouti à l'utilisation erronée du terme cellules dendritiques pour désigner ces cellules (revue (Park & Choi, 2005)).

## 3. Nomenclature et sous-types

Depuis leur découverte dans les années 70, les avancées scientifiques ont révélé l'exceptionnelle diversité des cellules dendritiques. Cette diversité s'explique par la variabilité entre espèces, entre tissus et selon les conditions inflammatoires. D'importants travaux sur le modèle murin ont permis d'identifier des signatures transcriptomiques pour favoriser la définition des sous-populations de DC (Dorner et al., 2009; Crozat et al., 2010; Contreras et al., 2010; Vu Manh et al., 2014). Des comparaisons inter-espèces ont étendu ces résultats et favorisent les échanges de connaissances entre domaines médicaux et vétérinaires (Figure 9) (Robbins et al., 2008; Bachem et al., 2010; Vu Manh et al., 2015). Dans l'ensemble de nos travaux, nous utiliserons la nomenclature proposée par Guilliams *et al.* (revue (Guilliams & van de Laar, 2015)).

Les DC peuvent être classifiées en 4 catégories : les DC conventionnelles ou classiques (cDC), les DC plasmacytoïdes (pDC) et les DC dérivées de monocytes (moDC) (Figure 8). Les cDC et pDC dérivent d'un précurseur nommé *Common DC Progenitor* (CDP) (Naik et al., 2007; Onai et al., 2013). Le développement des cDC dépend du facteur de croissance FLT3-L (Pulendran et al., 2000). Les cDC sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription Zbtb46 contrairement aux pDC. Le développement des pDC dépend de FLT3-L et du facteur de transcription E2-2 (revue (Satpathy et al., 2012; Durand & Segura, 2015). Les moDC dérives des monocytes eux-même différenciés à partir du *common monocyte progenitor* (cMoP) (Hettinger et al., 2013).

Dans la nomenclature que nous allons utiliser, les DC conventionnelles (cDC) se distinguent en deux sous-populations nommées cDC de type 1 (cDC1) ou de type 2 (cDC2). Les cDC1 sont efficaces pour l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ vers la voie T *helper* de type 1 (Th1) et des lymphocytes T $CD8^+$ *via* la présentation croisée. Les cDC1 produisent de l'IL-12 et jouent un rôle dans les réponses antivirales et anti-tumorales. Les cDC2 activent préférentiellement les lymphocytes T $CD4^+$ vers les voies Th2 ou Th17. Les cDC2 jouent un rôle dans les réponses contre les bactéries extracellulaires ainsi que dans les réponses allergiques et antiparasitaires. Ces cellules peuvent produire de l'IL-23. Parmi chaque population, il est possible d'identifier des cDC résidentes situées dans les organes lymphoïdes secondaires et des cDC migratoires qui migrent des tissus vers les ganglions. Les moDC se différencient majoritairement en conditions inflammatoires. Néanmoins, il a été montré que ces

cellules peuvent être présentes à l'état basal dans certains organes comme le poumon, la peau et l'intestin. Les moDC peuvent présenter les antigènes et migrer vers les ganglions même si leur capacité de migration semble plus faible que celles des cDC. Les moDC peuvent aussi présenter des antigènes et stimuler les lymphocytes T dans les tissus périphériques notamment en cas de réinfection. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont spécialisées dans la production d'IFN de type 1 et la réponse antivirale (revue (Merad et al., 2013; Dalod et al., 2014)).

Il faut noter que depuis la création de la nomenclature de 2014 (revue (Guilliams et al., 2014)) l'avancée des connaissances a abouti à de nouvelles classifications inter-espèces basées sur l'expression des facteurs de transcription IRF4 et IRF8 (Guilliams et al., 2016). Ainsi, dans les modèles murins et humains, les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) peuvent être subdivisées en cDC IRF8$^{+}$XCR1$^{+}$Sirpα$^{-}$ qui sont équivalentes aux cDC1 et en cDC IRF4$^{+}$ équivalentes aux cDC2 (Sichien et al., 2016). Au sein des cDC IRF4$^{+}$, il existe une hétérogénéité des populations aboutissant à la création de deux sous-catégories selon si leur différenciation est dépendante des facteurs de transcription Notch2 ou Klf4 (revue (Murphy et al., 2016)).

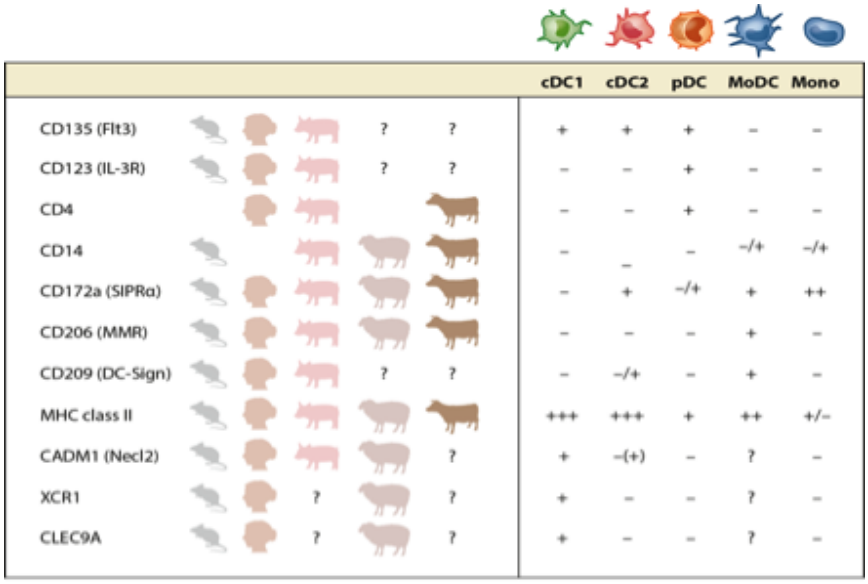



*Figure 9. Marqueurs inter-espèces des DC.*
*Adaptée de Summerfield et al., 2009.*

## 4. La maturation des DC

La détection des pathogènes par les DC se fait *via* des récepteurs présents à la membrane cellulaire et dans les compartiments intracellulaires. Parmi ces récepteurs dénommés *Pattern Recognition Receptor* (PRR) se trouvent notamment les récepteurs TLR et *NOD-like* (NLR). Les différents sous-types de DC n'expriment pas les mêmes panels de PRR. La présence du pathogène sur le site d'infection active une réaction inflammatoire favorisant le recrutement des cellules immunitaires innées sur ce site. Lorsque les DC sont en contact avec un antigène, ce dernier peut être internalisé par endocytose ou phagocytose. Ce mécanisme nécessite l'attachement des antigènes à des récepteurs cellulaires. L'antigène est ensuite dénaturé en peptides qui sont présentés sur les molécules du CMH-I et CMH-II. La présentation sur le CMH-I permet une présentation d'antigènes endogènes ou exogènes aux lymphocytes T $CD8^+$. En effet, les DC sont capables de faire une présentation croisée, c'est-à-dire de présenter des antigènes endocytés aux lymphocytes T $CD8^+$ (Figure 10) (Bevan, 1976) (revue (Reis e Sousa, 2006; Joffre et al., 2012; Dalod et al., 2014)).

Les antigènes endogènes sont transportés du cytosol au protéasome, où ils sont dégradés en peptides et transportés vers la lumière du Réticulum Endoplasmique (RE) *via* un transporteur nommé *Transporteur Associated Antigen* (TAP). Les peptides sont ensuite associés au CMH-I dans le RE et exportés vers la membrane des DC pour être présentés aux lymphocytes T. Les antigènes exogènes présentés sur le CMH-I proviennent de la présentation croisée. Deux voies existent : une voie vacuolaire où l'antigène ne sera pas en contact du cytoplasme et une voie cytoplasmique où les antigènes sont exportés vers le cytoplasme et vont suivre la voie canonique décrite pour les antigènes endogènes ci-dessus. Dans la voie vacuolaire, le pathogène est dégradé dans les endosomes par des enzymes protéolytiques avant d'être chargé sur le CMH-I (revue (Joffre et al., 2012)).

La présentation sur le CMH-II suit une voie endosomale. Le CMH-II est exprimé principalement sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les antigènes sont dénaturés en peptides dans les endosomes précoces. Les peptides sont ensuite associés au CMH-II dans des compartiments endosomaux riches en CMH-II, puis exportés à la membrane cellulaire et présentés aux lymphocytes T $CD4^+$.

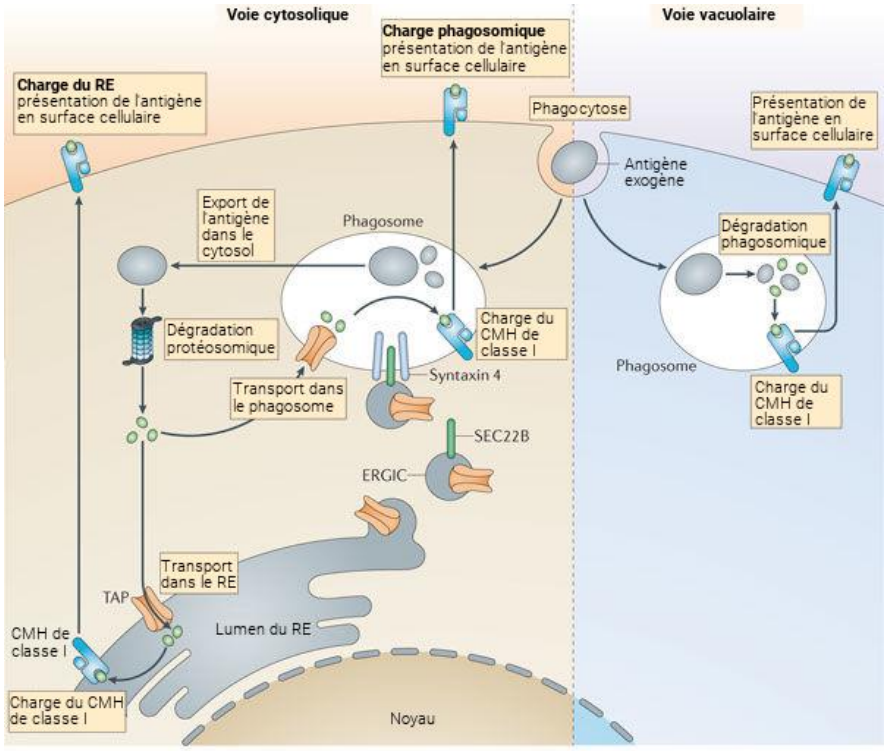



*Figure 10. Voies d'apprêtement et de présentation des antigènes par les DC. Traduit de Joffre et al., 2012.*

L'interaction entre les DC et les lymphocytes T naïfs dans les ganglions lymphatiques s'effectue après migration des DC du site d'infection vers le ganglion drainant correspondant au tissu d'origine des DC. Cette migration est concomitante avec la maturation des DC. Lors de cette maturation, l'expression des CMH augmente alors que les capacités de phagocytose diminuent. Les expressions des molécules de co-stimulation et du récepteur CCR7 nécessaire à la migration sont aussi régulées positivement. La migration est basée sur un phénomène de chimiotactisme impliquant CCR7 et les chimiokines CCL19 et CCL21 qui sont les ligands de ce récepteur. Ces chimiokines sont produites par les cellules endothéliales lymphatiques et les cellules stromales du ganglion (revue (Reis e Sousa, 2006; Dalod et al, 2014)).

## 5. Les connaissances chez le porc

### *Les cellules dendritiques de type 1 (cDC1)*

**Chez le porc**, les cDC1 ont été identifiées dans la peau, le sang et les poumons. Des travaux récents ont permis de définir ces cellules dans les amygdales (Thèse de Ferran Soldevilla Casada, *Royal Veterinary College*, Londres, 2017). Les cDC1 porcines expriment le

CMH-II, CD11c, XCR1 et CadM1. Elles sont négatives pour les marqueurs Sirpα (Marquet et al., 2011). XCR1 est un marqueur des cDC1 inter-espèces et inter-tissus (Contreras et al., 2010; Crozat et al., 2010; Bachem et al., 2010; Vu Manh et al., 2015). Ces cellules, tout comme les cDC2, migrent dans la lymphe pseudo-afférente *via* un mécanisme dépendant des chimiokines CCL19 et CCL21. Les cDC1 ont de très bonnes capacités de phagocytose des corps apoptotiques qu'elles transportent aux ganglions (Marquet et al., 2011; Marquet et al., 2014). Dans le poumon, les cDC1 favorisent préférentiellement une réponse Th1 et se distinguent des cDC2 par la non-expression du marqueur Sirpα (Maisonnasse et al., 2016).

### *Les cellules dendritiques de type 2 (cDC2)*

**Chez le porc**, les cDC2 se distinguent des cDC1 par leur expression de Sirpα, CD1 et FcεRIα (Auray et al., 2016; Edwards et al., 2017). Outre l'expression de ces 2 marqueurs, d'autres marqueurs sont nécessaires pour identifier ces cellules dans les différents tissus. Dans le sang, l'expression de CMH-II ainsi que la faible expression de CadM1 et CD123 permettent de les distinguer des cDC1 et des pDC (Auray et al., 2016). Dans le derme, une forte expression de CD11R3 (équivalent du CD11c chez le porc), une faible expression de CD163 et une non-expression de CadM1 ont permis d'identifier ces cellules (Marquet et al., 2011). Dans ce tissu, ces cellules sont capables d'activer des lymphocytes allogéniques T $CD4^+$ et $CD8^+$, ainsi que d'induire une réponse de type Th17 (Marquet et al., 2014). Dans le poumon, les cDC2 induisent préférentiellement une réponse Th2 (Maisonnasse et al., 2016).

### *Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)*

**Chez le porc**, les pDC porcines ont été identifiées dans le sang comme des *Natural Interferon-Producing cells* (Riffault et al., 1997; Summerfield et al., 2003). Un panel de marqueurs permet d'identifier ces cellules dans le sang. Elles expriment fortement le marqueur CD4, faiblement les marqueurs Sirpα, CD16, et CMH-II. Elles n'expriment pas les marqueurs CD3, CD1 et CD163 (Guzylack-Piriou et al., 2010). Leur profil transcriptomique a permis de valider leur identité et d'identifier les similitudes moléculaires partagées avec les pDC des autres mammifères (Vu Manh et al., 2015). Ces cellules sont capables de produire une forte quantité d'IFNα en réponse à des infections.

#### *Les cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDC)*

**Chez le porc**, la ségrégation des monocytes en deux populations existe et dépend de leur expression de CD163 (Chamorro et al., 2000). Les monocytes $CD16^{high}/CD163^{high}$ ont un profil transcriptomique proche des monocytes non classiques humains. Les monocytes $CD14^{high}$ ont un profil proche des monocytes classiques humains (Chamorro et al., 2005; Vu Manh et al., 2015).

Les monocytes peuvent se différencier en moDC ou en moMacro selon leur environnement. Dans le poumon de porc, les moDC sont présentes à l'état basal et en conditions inflammatoires. Ces cellules ont une durée de vie courte et ont été identifiées en 2015 par mon équipe (Maisonnasse et al., 2016). Les moDC du porc migrent faiblement en réponse à la chimiokine ganglionnaire CCL21 et induisent la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$ allogéniques *in vitro*. Ces cellules produisent les cytokines inflammatoires IL-1β et IL-18 après activation par des ligands de TLR (Maisonnasse et al., 2016). Le marqueur CD11b couramment utilisé pour la définition des monocytes dans d'autres espèces, n'est pas un bon marqueur de définition de population chez le porc.

## C. Les lymphocytes T

Dans les parties suivantes, nous décrirons les connaissances sur les lymphocytes T et B chez le porc. Ces connaissances nous permettront d'étudier l'impact de l'infection par le SDRPv sur la réponse immunitaire adaptative dans le chapitre 3 de cette introduction.

### 1. L'ontogénie des lymphocytes T

**Chez le porc** comme chez les autres vertébrés, les lymphocytes T ont pour origine des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Ces cellules souches se différencient en précurseurs lymphocytaires communs (CLP) dont une partie migre dans le thymus où aura lieu la formation des lymphocytes T. Après avoir subi des phénomènes de maturation et de sélection, les lymphocytes T naïfs migrent du thymus vers les ganglions lymphatiques où ils peuvent devenir des lymphocytes T activés. L'activation des lymphocytes T par les DC et l'induction de l'expansion clonale nécessitent la présence de 3 signaux de co-stimulations : l'interaction TCR – CMH, les signaux de co-stimulation et la sécrétion de cytokines. L'interaction du CMH chargé d'un peptide antigénique avec le TCR des lymphocytes permet la transduction du signal dans ces cellules aboutissant à l'activation des gènes de prolifération et de différenciation

cellulaire. Les molécules de co-stimulation présentes à la surface des DC interagissent avec d'autres molécules complémentaires à la surface des lymphocytes T. Ces molécules de co-stimulation peuvent être activatrices ou inhibitrices. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 par les DC participe à la polarisation fonctionnelle des lymphocytes T CD4+ (revue (Thaiss et al., 2011)).

## 2. Les lymphocytes T chez le porc

Récemment, le développement de nouveaux anticorps monoclonaux chez le porc a permis d'augmenter considérablement les connaissances sur les sous-populations de lymphocytes.

*Tableau 2. Caractéristiques des lymphocytes porcins.*
*Adapté à partir de Grener et al., 2009.*

| Lymphocytes | Marqueurs | Fréquence des lymphocytes du sang |
|---|---|---|
| NKs | $Perforin^{+}CD2^{+}CD3^{-}CD4^{-}CD5^{-}CD6^{-}CD8\alpha^{+}CD8\beta^{-}CD11\beta^{+}CD16^{+}$ | 2 à 10 %, variation en fonction de l'âge |
| T NKs | $Perforin^{+}CD3^{+}CD6^{-}CD11\beta^{+}CD16^{+}$ | 0.5 à 3 % |
| T γδ | $CD3^{+}TCR\text{-}\gamma\delta^{+}$ | 5 à 50 %, diminue avec l'âge |
| T cytotoxiques | $CD3^{+}CD4^{-}CD8\alpha^{+}CD8\beta^{+}$ | 8 à 21%, jusqu'à 40% |
| *T-helper (Th)* | $CD3^{+}CD4^{+}CD8\alpha^{+}$ | 19 à 60% |
| Th1 | $CD3^{+}CD4^{+}$ | Donnée inconnue |
| Th2 | $CD3^{+}CD4^{+}$ | Donnée inconnue |
| Th17 | Pas de marqueurs spécifiques | Donnée inconnue |
| T reg | $CD4^{+}CD25^{high}Foxp3^{+}$ | 1 à 3% |

### *Les lymphocytes TCR-αβ*

Chez le porc, les lymphocytes T $CD4^{+}$ sont $CD3^{+}$ et peuvent exprimer ou non CD8α. Chez le porc, le récepteur CD8α est exprimé sous forme de dimères CD8α/CD8α sur les T $CD4^{+}$ mémoires; et sous forme CD8α/CD8β sur les lymphocytes T $CD8^{+}$ (Yang & Parkhouse, 1997; Saalmüller et al., 1999). L'activité cytolytique se retrouve principalement dans des cellules $CD4^{-}CD6^{+}CD8\alpha^{high}CD8\beta^{+}$. Les lymphocytes T *helpers* de type mémoires sont inclus dans les cellules $CD4^{+}CD8\alpha^{+}$. Cet élément a notamment été découvert avec l'augmentation du nombre de ces cellules au cours de la vie des individus. Les rôles des autres sous-populations ne sont pas encore élucidés (revue (Gerner et al., 2009)).

### *Les lymphocytes Th1/Th2*

L'identification des lymphocytes Th1 et Th2 chez le porc date de l'année 2014. Lors d'infections *in vivo* avec le SDRPv et le pathogène parasitaire *Trichuris suis*, les auteurs ont démontré que le facteur de transcription T-bet était induit dans les lymphocytes $CD4^+$ après l'infection virale alors que GATA-3 était induit suite à l'infection parasitaire (Ebner et al., 2014). Cependant, la comparaison du SDRPv avec d'autres infections virales serait nécessaire afin de valider l'importance de la réponse Th1. De plus, il est possible qu'une variabilité existe entre les souches de SDRPv car certaines souches induisent une forte quantité d'IL-10, en faveur d'une polarisation de type Th2 ou Treg. La définition de la réponse Th1/Th2 est donc relativement récente chez le porc et la plupart des études se base sur des résultats de qPCR et sur la production de cytokines testée sur l'ensemble des lymphocytes.

### *Les lymphocytes Th17*

Chez l'Homme et la souris, les lymphocytes Th17 participent à la réponse immunitaire face aux bactéries extracellulaires en produisant des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-17 et l'IL-22 (Liang et al., 2006). En 2009, des lymphocytes porcins produisant de l'IL-17 ont été décrits pour la première fois (Pilon et al., 2009) mais très peu d'études ont été faites sur ces cellules chez le porc.

### *Les lymphocytes T reg*

Depuis 2008, des lymphocytes Treg ont été identifiés chez le porc grâce à leur expression du facteur de transcription FoxP3 (Käser et al., 2008a). Ces lymphocytes $CD4^+CD25^+$ participent à la régulation de la réponse immunitaire en produisant de l'IL-10 et du TGF-β. Les lymphocytes Treg du porc ont les mêmes capacités d'inhibition de la réponse immunitaire que chez les autres espèces. Après stimulation par un antigène, les Treg sont capables d'inhiber la prolifération et les capacités effectrices des autres lymphocytes T (Käser et al., 2008b).

### *Les lymphocytes T γδ*

Chez le porc, les lymphocytes T γδ représentent 5 à 50% des lymphocytes du sang et la fréquence de ces cellules diminue fortement avec l'âge (Yang et al., 1996). Outre le TCR-γδ, ces cellules peuvent exprimer CD8α et CD2 mais n'expriment pas le CD4. Au niveau

fonctionnel, une prolifération et une production d'IFNγ ont été détectées dans ces cellules face à des mycobactéries. De manière très intéressante, cette réponse était augmentée chez les porcs vaccinés par le Bacille Calmette Guerin (BCG), illustrant un rôle potentiel de ces cellules dans la réponse mémoire (Lee et al., 2004). Takamatsu *et al.* ont donné les premières preuves d'une capacité présentatrice des lymphocytes porcins T γδ qui expriment le CMH-II et les molécules de co-stimulation CD80/86 (Takamatsu et al., 2002). Les fonctions cytolytiques des lymphocytes T γδ et leur rôle dans l'inflammation ont été peu étudiées chez le porc.

## D. Les lymphocytes B

### 1. L'ontogénie des lymphocytes B

Après comparaisons inter-espèces, il fut supposé dans les années 80 que le développement des lymphocytes B chez le porc avait lieu dans les plaques de Peyer de l'iléon (IPP). Récemment, Sinkora *et al.* ont démontré que la lymphogenèse avait lieu dans la moelle osseuse (Sinkora & Sinkorova, 2014). Cette même équipe a décrit que l'IPP n'était pas nécessaire au développement et au maintien des lymphocytes B (Sinkora et al., 2011). Les lymphocytes B ont pour origine des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Ces cellules souches se différencient en précurseurs lymphocytaires communs (CLP) dont une partie migre dans le thymus où aura lieu la formation des lymphocytes T. Les CLP de la moelle osseuse vont eux former les cellules nommées pro-B qui subissent des phénomènes de maturation et de sélection avant d'aboutir aux lymphocytes B (LB) matures naïfs. Sinkora *et al.* ont identifié les étapes de différenciation des lymphocytes B dans la moelle osseuse : du précurseur aux B matures (Sinkora et al., 2013). Au niveau phénotypique, les lymphocytes B matures expriment CD2, CD21, CD25 et n'expriment pas Sirpα (Sinkora & Sinkorova, 2014). Après formation dans la moelle osseuse, les lymphocytes B vont migrer dans les organes lymphoïdes secondaires et subir une activation s'ils rencontrent l'antigène correspondant à leur BCR (revue (Butler et al., 2017)).

### 2. La rencontre avec l'antigène

Chez la souris, l'antigène entre dans les ganglions par le sinus sous-capsulaire et peut être pris en charge par les macrophages SCSM. Dans le sinus sous-capsulaire, les SCSM capturent les antigènes opsonisés par le complément *via* leur récepteur *complement receptor 3*

(CR3) (Figure 11). Une fois capturé, le complexe antigène-complément peut être transféré à la surface des lymphocytes B naïfs sur le récepteur CR2 (aussi nommé CD21) de manière indépendante du BCR (Phan et al., 2009) ou d'une manière dépendante d'une interaction BCR-antigène spécifique (Junt et al., 2007; Phan et al., 2009). Les lymphocytes B naïfs transfèrent ensuite l'antigène aux cellules dendritiques folliculaires (*follicular dendritic cell*, fDC) (revue (Heesters et al., 2013)). Si l'antigène se trouve dans la médulla, il est capté par les lymphocytes B naïfs et les DC médullaires qui le transfèrent aux fDC. Les fDC sont capables de conserver des antigènes intacts durant une longue période dans un compartiment non-dénaturant et de les présenter à leur surface membranaire de manière périodique (revue (Heesters et al., 2013)). Ces cellules participent à la mise en place et au maintien des centres germinatifs (CG). La disponibilité des antigènes à leur surface joue un rôle important dans la compétition entre antigènes aboutissant à une sélection des clones de haute affinité. Chez le porc, ces interactions cellulaires et ces mécanismes dans le ganglion ne sont pas encore décrits.

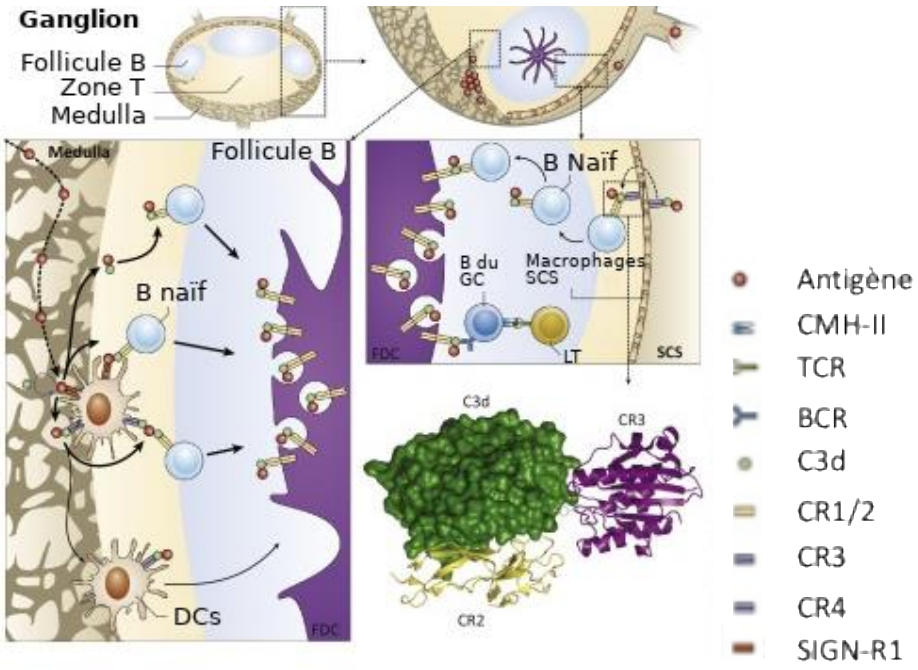



*Figure 11. Transport de l'antigène dans le ganglion de souris.*
Traduit de Heesters et al., 2016.

## 3. La formation des centres germinatifs

L'activation des lymphocytes B naïfs dans les organes lymphoïdes nécessite la rencontre

avec l'antigène spécifique du BCR. Après présentation de l'antigène notamment par les DC, le lymphocyte B (LB) peut s'activer et devenir soit un plasmablaste extra-folliculaire ou participer à la formation d'un centre germinatif (CG). Les plasmablastes extra-folliculaires permettent une sécrétion rapide d'anticorps spécifiques du pathogène mais produisent des anticorps de faible affinité. Dans le CG, les LB subissent des étapes d'hypermutation somatique (HSM), de maturation et de sélection avant de devenir des plasmablastes produisant des anticorps de haute affinité ou des LB mémoires (revue (Heesters et al., 2016)).

Le centre germinatif peut être divisé en 2 zones : la zone sombre (*dark zone*, DZ) et la zone claire (*light zone*, LZ). La zone sombre est le lieu de diversification et de division active des lymphocytes B. Dans cette zone, les LB sont appelés centroblastes et subissent les hyper-mutations somatiques. La zone claire est le lieu de la sélection des B ayant une haute affinité pour l'antigène et de la commutation isotypique. Dans la zone claire se trouve des lymphocytes *helper* folliculaires (Tfh) et un réseau dense de cellules dendritiques folliculaires (fDC) qui présentent les antigènes. Dans cette zone, les LB nommés centrocytes et ils peuvent se différencier en plasmablastes ou en B mémoires (Figure 12). Les lymphocytes B du CG subissent plusieurs étapes de mutation et de sélection, par des migrations répétées entre LZ et DZ. Durant ces étapes de sélection, de nombreux LB subissent une apoptose et leurs corps cellulaires sont éliminés par des macrophages présents dans le ganglion (revue (Klein et al., 2008)).

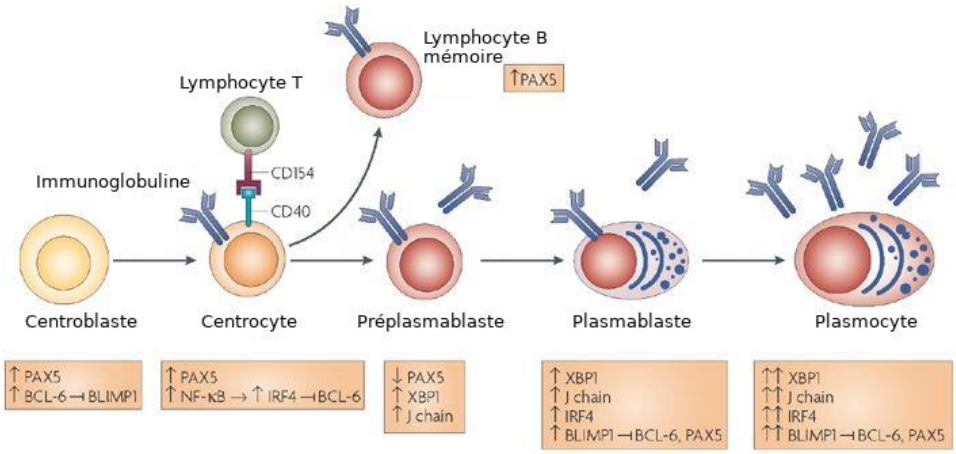



*Figure 12. Différenciation des lymphocytes B.*
*Traduit de Klein et al., 2008.*

## 4. Les programmes de différenciation

Les gènes impliqués dans les différentes étapes de différenciation des B ont été étudiés récemment chez la souris. *BCL-6* est le principal gène qui régule le développement des lymphocytes B dans le centre germinatif. La protéine BCL-6 est un facteur de transcription inhibiteur exprimé dans les centroblastes et les centrocytes (Cattoretti et al., 1995). Le développement des LB dans les souris KO pour BCL-6 est conservé mais aucun centre germinatif n'est formé et l'affinité des anticorps produits contre un antigène est faible (Ye et al., 1997; Dent et al., 1997). Par son action, BCL-6 permet aux centroblastes de rester indifférenciés et de supporter le stress génotoxique associé aux mécanismes d'hypermutations somatiques (revue (Klein et al., 2008)).

Les signaux responsables de la différenciation des centrocytes en plasmablastes et en B mémoires impliquent différents facteurs de transcription. L'inhibition du gène *PAX-5* est la première étape dans la différenciation des centrocytes en plasmablastes (Figure 12). Cette inhibition aboutit à l'établissement de cellules nommées pré-plasmablastes qui sécrètent des anticorps de faible affinité (Kallies et al., 2007). Cette étape est suivie de la régulation positive des facteurs XBP1, IRF4 et BLIMP-1 et la suppression de l'expression de BCL-6. La fin de l'expression de BCL-6 permet aux cellules d'exprimer les gènes de la différenciation en B mémoires ou en plasmocytes. Cette extinction de l'expression de BCL-6 dans les centrocytes est médiée par l'interaction des B avec les cellules immunitaires de la zone claire et les signaux *via* le BCR et CD40 (Shaffer et al., 2000).

BLIMP-1 est un régulateur crucial pour la différenciation en plasmocytes (Turner et al., 1994). XBP-1 est un facteur de transcription impliqué dans le phénotype sécréteur des plasmocytes (Reimold et al., 2001). IRF-4 est un facteur clé de la régulation de la différenciation en plasmocytes (Klein et al., 2006). Les expressions de BLIMP-1, IRF-4 et XBP-1 sont régulées de manière indépendante, mais il a été montré que ces 3 facteurs de transcription sont requis ensemble pour l'établissement des plasmocytes différenciés (Kallies et al., 2007). Les B mémoires continuent à exprimer *PAX-5* et c'est le facteur de transcription STAT-5 qui est suggéré comme le principal facteur de différenciation des centrocytes en B mémoires (Scheeren et al., 2005).

## 5. La production d'anticorps de haute affinité

Le développement d'anticorps neutralisants est complexe, les LB subissent de multiples

étapes de sélection avec des conditions d'affinité de faibles à modérées. Ainsi, un modèle d'acquisition d'affinité uniquement basé sur une compétition dont seuls les lymphocytes avec le plus haut taux d'affinité seraient sélectionnés ne suffit pas à expliquer la mise en place d'anticorps neutralisants. Une permissivité pour des anticorps à plus faibles affinités et une diversité des LB est nécessaire (revue (Klein & Dalla-Favera, 2008; Heesters et al., 2016; Bannard & Cyster, 2017)). Cette permissivité fournit une diversité de LB dans le CG qui peut jouer un rôle primordial en cas de réinfection ou d'infection par un mutant du même virus. Pour montrer cette permissivité, Kuraoka *et al.* ont mis en place une culture *ex vivo* de centre germinatif. Après immunisation avec le virus de la grippe, ils ont montré que l'affinité des anticorps pour l'antigène augmentait bien avec le temps. Mais ceci n'était pas aux dépends des LB à faibles affinités et il n'existait pas de diminution de la diversité clonale (Kuraoka et al., 2016). Tas *et al.* ont montré qu'une fois établi, le destin des CG varie grandement. Certains devenant dominés par un seul clone alors que la composition en LB d'autres CG reste très diverse (Tas et al., 2016).

Dans ce chapitre, il a été décrit que les macrophages peuvent se mettre en place dans les tissus durant la période embryonnaire ou après la naissance. Dans le cas de l'infection par le SDRPv, les macrophages sont connus comme la cible principale du virus. Les connaissances sur les macrophages des ganglions restent faibles chez le porc. Dans le poumon, les AM-like constituent une nouvelle cible potentielle du SDRPv. Pour la classification des DC, nous utiliserons dans nos travaux la classification proposée par Guilliams *et al.* comprenant les DC conventionnelles (cDC1 et cDC2), les DC plasmacytoïdes (pDC) et les DC dérivées de monocytes (moDC). Dans le poumon de porc, les cDC1, les cDC2 et les moDC ont été identifiées par mon équipe en 2015. Dans le cas de l'infection par le SDRPv, les DC du poumon pourraient être une cible potentielle du virus. L'infection des cellules de l'immunité innée par le SDRPv pourrait influencer la mise en place des réponses adaptatives. Dans ce chapitre, nous avons détaillé les connaissances sur les lymphocytes T et B chez le porc. Dans le chapitre suivant, nous relaterons les interactions connues entre le virus du SDRPv et les réponses immunitaires innées et adaptatives.

# Chapitre 3 – La Réponse immunitaire anti-SDRPv

La réponse immunitaire du porc face au SDRPv est considérée comme une réponse faible voir défaillante. Pour la plupart des souches, cette infection est persistante. De plus, la réponse innée est faible et l'établissement des réponses adaptatives est retardé.

Au vu des connaissances actuelles, les réponses immunitaires contre les types 1 et 2 semblent assez différentes. Il est donc nécessaire de toujours distinguer les réponses contre chacun des types de SDRPv. Dans ce chapitre, nous dépeindrons les connaissances actuelles sur la réponse immunitaire et les hypothèses sur les mécanismes impliqués.

## A. La réponse innée

Plusieurs études ont démontré que le SDRPv était capable de moduler la réponse innée de l'hôte *via* la diminution de l'activité cytotoxique des cellules *Natural Killers*, l'inhibition de la production d'IFNα par les cellules immunitaires et la modulation des fonctionnalités des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques.

### 1. Les lymphocytes Natural Killers

Lors d'une infection virale, une réponse innée est nécessaire pour induire une réponse adaptative adéquate afin de combattre les pathogènes intracellulaires en endiguant la réplication et l'invasion des muqueuses (revue (Koyama et al., 2008)). Les cellules *Natural Killers* (NK), sont des lymphocytes de l'immunité innée qui participent à l'élimination des cellules infectées de manière non-spécifique de l'antigène. Chez les porcelets, les NK sont plus fréquents que chez l'adulte mais ont une activité cytotoxique réduite (revue (Gerner et al., 2009)). Chez le porc, les NK peuvent être caractérisés par leur expression des marqueurs $CD2^{+}CD3^{-}CD6^{-}CD8\alpha^{+}CD8\beta^{-}CD11\beta^{+}CD16^{+}$ (Denyer et al., 2006). Deux populations distinctes de NK existent en fonction de leur expression ou non du CMH-II. Au niveau fonctionnel, les NK porcins peuvent être stimulés par de l'IFNγ ou de l'IL-2. La cytokine IL-12 est capable d'augmenter l'activité cytotoxique et la sécrétion de TNF-α des NK. De plus, un effet synergique de l'IL-2, de l'IL-12 et de l'IL-18 existe sur l'activité cytotoxique, l'expression de perforine et la production d'IFNγ (Pintarič et al., 2008).

Pour les infections avec les virus de **type 1**, il a été montré qu'avec la souche Lelystad, les capacités cytotoxiques des NK sont réprimées *via* une inhibition de la dégranulation cellulaire (Cao et al., 2013). Il est supposé que dans les phases précoces d'infection, ce sont les NK et les lymphocytes T γδ qui produisent majoritairement l'IFNγ. Au vu de cette hypothèse, il est possible qu'une variabilité entre les souches européennes existe. Une cinétique de la quantité d'IFNγ dans le lavage broncho-alvéolaire (BAL) de porcs infectés avec la souche virulente Lena (type 1.3) et la souche faiblement virulente Finistère (type 1.1) a révélé des différences. En effet, la souche Lena induit dès 4 jours une quantité importante d'IFNγ dans le BAL alors qu'un tel résultat n'est pas observé avec la souche Finistère (Renson et al., 2017). Néanmoins, les cellules à l'origine de cette production n'ont pas encore été totalement identifiées et de nouveaux travaux seront nécessaires pour répondre à cette question.

L'infection par des souches de **type 2**, induit une diminution de l'activité cytotoxique du SDRPv sans diminuer le nombre de NK. Cette diminution est détectée après deux jours d'infection et dure jusqu'à 3 à 4 semaines (Renukaradhya et al., 2010; Dwivedi et al., 2012). Les mécanismes potentiels d'interaction du SDRPv avec les NK sont une modulation des cytokines qui participent à la régulation de l'activité de ces cellules (IFN de type 1, l'IL-12 et l'IL-15) et une inhibition de la voie STAT1 (Lee et al., 2000). Malgré une activité cytotoxique diminuée, les NK jouent probablement un rôle majeur dans la réponse face au SDRPv. En effet, dans les infections par le virus de type 2, ce sont les NK et les lymphocytes T γδ qui produisent l'IFNγ dans les phases précoces d'infection (Johnson et al., 2004).

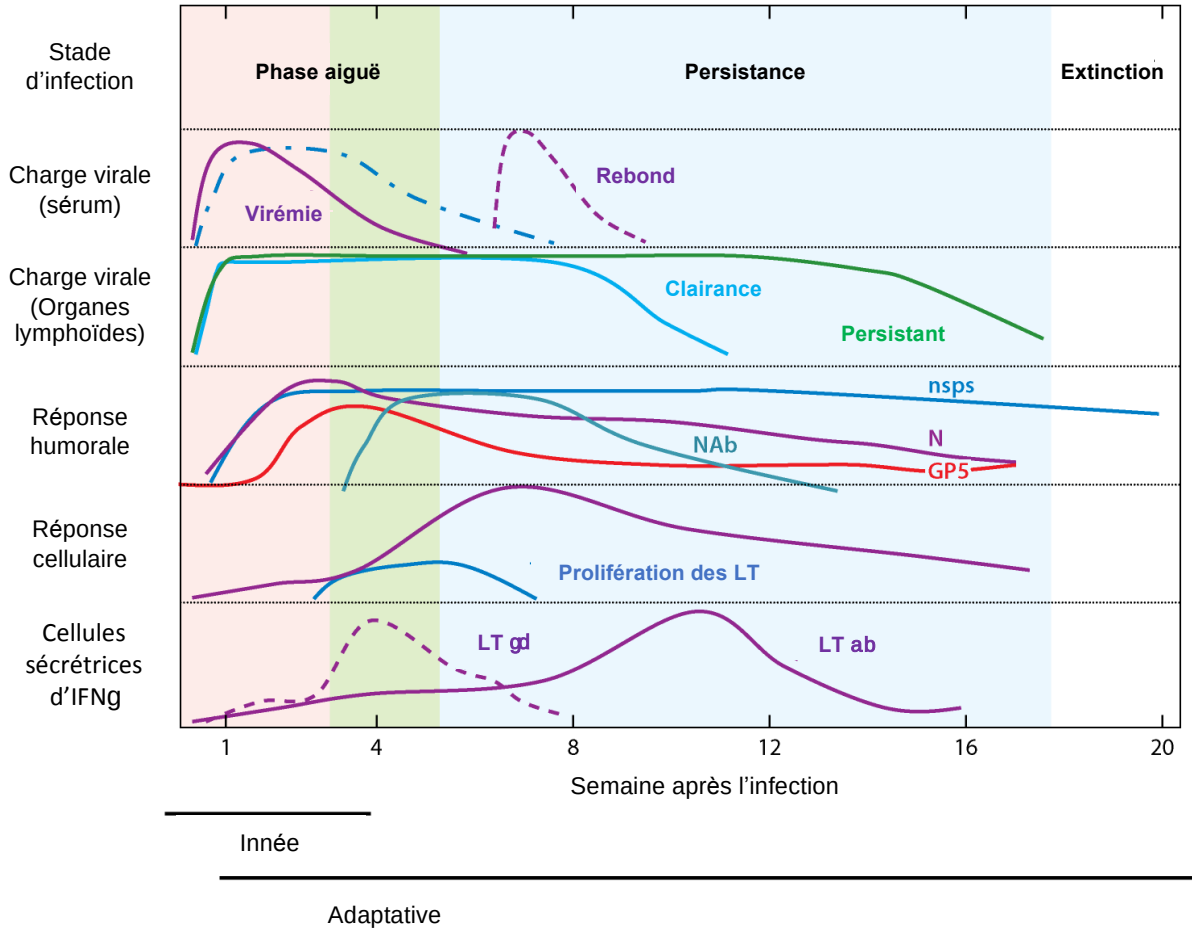



*Figure 13. Evolution des facteurs immunologiques après l'infection.*

*Traduit de Lunney et al., 2016.*

Légende : Pour la charge virale : les 3 types d'évolution de la virémie sont représentés : une élimination rapide (violet, trait plein), une élimination lente (bleu, pointillé) et les cas de rebond de la virémie (violet, pointillé). Pour la réponse cellulaire : la prolifération des cellules totales impliquées dans cette réponse est représentée en violet ; la prolifération des lymphocytes T est représentée en bleu.

## 2. Production d'interféron de type 1

La sécrétion d'interféron α (IFNα) par les cellules infectées favorise la résistance à l'infection. Après sécrétion dans le milieu extracellulaire, l'IFNα se fixe sur son récepteur (IFNAR) présent à la surface des cellules. Après transduction du signal, les gènes appelés *IFN-stimulated genes* (ISG) vont être activés et participer à la réponse immunitaire antivirale. Certaines cellules immunitaires comme les macrophages ou les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont capables de produire une grande quantité d'IFNα en réponse à des

infections (revue (Rizza et al., 2015)).

Dans le cas des souches de type 1 et 2, l'infection des macrophages alvéolaires (AM) et des moDC *in vitro* n'induit pas ou peu de production d'IFNα (Albina et al., 1998; Zhang et al., 2012). Néanmoins, une concentration notable d'IFNα dans le sérum est induite avec les souches de type 1 et 2 (Van Reeth et al., 1999) et plus particulièrement avec les souches hautement pathogènes chinoises (Guo et al., 2013). Cette concentration reste faible comparée aux virus porcins de la grippe ou du coronavirus (Van Reeth et al., 1999). Ainsi, on estime *in vivo* que la capacité d'induction d'IFNα dans le sérum est 159 fois plus faible que celle du coronavirus (Buddaert et al., 1998). Au sein des souches de type 1, on retrouve une variabilité. En effet, la souche virulente Lena induit une augmentation plus forte et plus rapide de la concentration d'IFNα dans le sérum que la souche Finistère. Les auteurs suggèrent que cette concentration supérieure avec la souche Lena pourrait participer à la mise en place de la forte réponse IFNγ observée avec cette souche (Renson et al., 2017).

La faible production d'IFNα est due à une capacité inhibitrice du SDRPv. Pour démontrer ces propriétés inhibitrices, Albina *et al.* ont infecté des macrophages avec ce virus puis pratiqué une sur-infection avec le virus du *swine transmissible gastroenteritis virus* (TGEV), connu pour ses propriétés inductrices d'IFNα. En présence de SDRPv, la production d'IFNα induite par le TGEV était inhibée. Les mécanismes de cette inhibition ont été étudiés *in vitro* et ont révélé que les protéines virales NSP1, NSP2, NSP11 et N étaient responsables de cette inhibition en interférant avec les voies de signalisation IRF3, NF-κB et JAK/STAT (revue (Butler et al., 2014)).

L'infection par le SDRPv est sensible à la présence d'IFN de type 1 *in vitro* et *in vivo*. Le traitement des AM *in vitro* avec de l'IFNα ou de IFNβ protège ces cellules de l'infection (Buddaert et al., 1998; Overend et al., 2007). *In vivo* lorsque les porcs sont inoculés 2 jours avant infection par un adénovirus exprimant de l'IFNα, les lésions pulmonaires sont moins nombreuses et la virémie est retardée (Brockmeier et al., 2009). Dans ce modèle, il a été montré que la présence d'IFNα au moment de l'infection altère l'activation des réponses immunitaires innée et adaptative (Brockmeier et al., 2012). L'ensemble de ces éléments illustre la susceptibilité du virus à cette cytokine.

Les pDC sont l'une des sources majeures d'IFNα *in vivo*. La production d'IFNα est déclenchée après la détection d'ARN double brin ou d'ADN par les *Toll-like recepteurs* (TLR) 7 ou TLR9 respectivement. Ces récepteurs sont présents sur la membrane interne des endosomes (revue (Liu, 2005)). Une étude a montré que les pDC étaient capables de produire de l'IFNα en réponse à la présence des souches de SDRPv de type 1 et 2. Cette production ne nécessitait ni la présence du virus vivant ni une infection directe des pDC et était dépendante du TLR7 (Baumann et al., 2013). De manière très intéressante, la souche Lena se distingue de toutes les autres souches européennes. En effet, *in vitro*, cette souche n'a pas la capacité d'activer les pDC de manière directe, seule une activation médiée par le contact entre les pDC et des macrophages infectés par cette souche a été observée (García-Nicolás et al., 2016).

## 3. Les interactions du SDRPv avec les DC et les macrophages

La réponse immunitaire innée active la réponse immunitaire adaptative notamment grâce aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui présentent l'antigène aux lymphocytes naïfs. Cette présentation et l'activation des lymphocytes nécessitent 3 facteurs de stimulation : 1) l'interaction des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présentes sur la membrane des CPA avec les récepteurs membranaires de l'antigène (*T cell receptor* : TCR) des lymphocytes ; 2) l'interaction entre des molécules de co-stimulation présentes sur la membrane des CPA et leurs homologues sur la membrane des lymphocytes (par exemple : CD40 et son ligand CD40L) ; 3) la production de cytokines par les CPA. Parfois lors d'infections virales, un ou plusieurs de ces signaux sont altérés par l'infection, impactant la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Dans les paragraphes suivants, nous décrirons les interactions connues entre le SDRPv et les 3 facteurs de stimulation précédemment décrits.

### *Les capacités de présentation d'antigènes*

Dans le cas des infections de type 1, il n'y a pas de consensus quant à l'impact de l'infection sur l'expression des molécules de co-stimulation. Seules quelques études sur des bmDC différenciées *in vitro* ont été réalisées. Avec la souche Lena, une diminution de l'expression des marqueurs CMH-I, CMH-II et CD80/86 sur les bmDC a été décrite (Weesendorp et al., 2013). Avec la souche Lelystad, aucune modification n'a été observée. Salguero *et al.* ont émis l'hypothèse que la faible réponse immunitaire induite par les souches

peu virulentes ne serait pas due à un caractère immunosuppresseur du virus mais à un défaut de reconnaissance du virus par les DC. Dans cette hypothèse, les souches virulentes seraient les seules à être efficacement détectées par les DC induisant ainsi une réponse inflammatoire très forte à l'origine de symptômes cliniques (Salguero et al., 2015).

Des études ont montré une modification de l'expression des molécules de co-stimulation présentes à la surface des DC après une infection de type 2. Des moDC différenciées et infectées *in vitro* ont montré une modification de l'expression des molécules CMH-I, CMH-II, CD40, CD14 et CD80 (Wang et al., 2007). Ces molécules sont impliquées dans l'activation des lymphocytes T spécifiques de l'antigène. Malheureusement, la complexité et la variabilité des modèles d'étude *in vitro* aboutissent à des résultats contradictoires. Ainsi, des augmentations et des diminutions de l'expression de CD80/86 sur les bmDC ont été décrites avec les souches de type 2 (Chang et al., 2008; Gimeno et al., 2011).

### *Les capacités de production de cytokines*

Outre la capacité d'inhibition de la production d'IFNα, le SDRPv semble capable d'inhiber la production d'autres cytokines. La comparaison entre la souche Lelystad et le virus de la grippe permet d'illustrer cette assertion. Avec la grippe, de fortes concentrations des cytokines IFNα, IL-1 et TNFα sont produites dans le poumon. Cette induction coïncide avec les symptômes et la clairance virale. Dans le cas du SDRPv, une quantité importante d'IL-1 est bien produite mais la production d'IFNα est faible et celle de TNFα indétectable dans le BAL (Van Reeth et al., 1999). Néanmoins, la diversité des résultats obtenus selon les souches complique la compréhension des mécanismes impliqués dans cette inhibition.

Dans le cas de virus de type 1, la plupart des souches de virulence faible à modérée n'induisent pas la production de cytokines inflammatoires en grande quantité. Néanmoins, la souche virulente Lena se distingue en induisant une forte production de cytokines inflammatoires. Cette induction a notamment été démontrée pour les cytokines TNFα, IL-1β et IL-8 dans le BAL après 8 jours d'infection (Renson et al., 2017). Pour les virus de type 2, des résultats contradictoires ont été obtenus et ne permettent pas de conclusions claires.

Dans le cas de l'IL-10, des résultats contradictoires existent mais la plupart des papiers suggèrent que cette cytokine est un élément important de l'infection SDRPv. La variabilité des résultats obtenus est probablement due à la diversité des souches virales. Silva-Campa *et al.* ont

montré une variabilité dans la production d'IL-10 par les moDC différenciées *in vitro* en fonction de la souche de type 1 utilisée (Silva-Campa et al., 2010). Avec les virus de type 2, Wang *et al.* n'observent pas d'induction d'IL-10 après infection dans les moDC différenciées *in vitro* (Wang et al., 2007). Par opposition, Florez-Mendoza *et al.* observent une production d'IL-10 dans des moDC matures différenciées *in vitro* (Flores-Mendoza et al., 2008).

Après 2 jours d'infection avec un virus de type 2, la sécrétion d'IL-4 dans le sérum de porc est augmentée chez plus de 90 % des individus (Dwivedi et al., 2012). Dans les modèles murins et humains, l'IL-4, essentiel pour la production d'anticorps, est un marqueur de la réponse *T helper* de type 2 (Th2). Chez le porc, l'IL-4 n'est pas un facteur de stimulation des lymphocytes B et cette cytokine est capable de supprimer la prolifération des lymphocytes B spécifiques de l'antigène (Murtaugh et al., 2009). Néanmoins, il a été montré que l'IL-4 dans les AM porcins joue un rôle important dans la régulation de la production des cytokines inflammatoires (Zhou et al., 1994). Dans le cas du SDRP, l'IL-4 est supposé participer à la modulation de la réponse immunitaire innée dans les phases précoces d'infection (revue (Lunney et al., 2016)).

En conclusion de cette partie, il existe des différences importantes dans les réponses immunitaires face au SDRPv selon le type 1 ou 2. Dans le cas des souches de type 1, l'infection impacte la réponse immunitaire en inhibant les capacités cytotoxiques des NK et la production de cytokines comme l'IFNα. Aucun résultat clair n'existe sur les capacités des souches de type 1 à modifier la présentation d'antigènes par les DC. Les souches de type 1.3 telles que la souche Lena se distinguent des autres souches européennes par une forte réponse inflammatoire. Les type 1.3 induisent une sécrétion importante et rapide d'IFNα ainsi que d'autres cytokines inflammatoires. Dans le cas des souches de type 1.3, la réponse innée ne semble pas impactée par l'infection mais les réponses adaptatives face à ces souches ont été peu étudiées. Dans les paragraphes suivants, nous décrirons les connaissances actuelles sur les réponses immunitaires humorales et cellulaires face aux souches de type 1 et 2.

## B. La Réponse adaptative

### 1. La réponse des lymphocytes T

La prolifération des lymphocytes T est détectable à partir de 4 semaines après l'infection. Plusieurs équipes ont reporté une augmentation des lymphocytes T $CD8^+$ dans le sang et les

tissus durant les premières semaines d'infection. Néanmoins, Costers *et al.* ont montré que malgré une augmentation des lymphocytes T $CD8^+$ avec la souche Lelystad, ces cellules n'ont pas d'activité cytotoxique (Costers et al., 2009). Récemment, la piste d'une induction d'apoptose dans les lymphocytes B et T a été évoquée (Gómez-Laguna et al., 2013). Cette apoptose semble aggravée avec les souches hautement virulentes (Wang et al., 2014). La majorité des études sur la réponse cellulaire face au SDRPv se base sur la technique EliSpot permettant de quantifier le nombre de lymphocytes producteurs d'IFNγ dans le sang après re-stimulation. Cette technique permet de suivre le nombre de lymphocytes circulants spécifiques du virus. L'IFNγ est une cytokine qui joue un rôle primordial dans la réponse antivirale. Une fois produite cette cytokine participe à l'activation des NK, des macrophages et des lymphocytes. Il a été montré que les protéines virales M, N, GP5, NSP1β et NSP5 du SDRPv sont les principales cibles de la réponse T (Bautista & Molitor, 1997; Mokhtar et al., 2014; Mokhtar et al., 2016).

Dans les infections de type 1, les cellules sécrétrices d'IFNγ se développent rapidement (Díaz et al., 2006). Plusieurs études corrèlent la présence de cellules sécrétrices d'IFNγ et la protection contre l'infection. Ainsi, la protection contre le développement d'une virémie après un deuxième challenge est plus efficace chez les porcs avec une forte fréquence de cellules productrices d'IFNγ spécifiques du SDRPv (Díaz et al., 2006). Le développement de cellules productrices d'IFNγ est corrélé à la protection partielle induite par la vaccination (Martelli et al., 2009).

Dans les infections de type 2, les cellules sécrétrices d'IFNγ se développent entre 2 et 3 semaines après l'infection. Néanmoins, la fréquence des cellules sécrétrices au sein des cellules mononucléées du sang (*peripheral blood mononuclear cell* ; PBMC) évolue de manière erratique pendant plusieurs semaines avant d'atteindre un plateau. La représentation des cellules sécrétrices d'IFNγ est plus faible que celle induite par d'autres infections virales telles que la pseudorage porcine (Meier et al., 2003). Durant les 8 premières semaines d'infection, ce sont les NK et les lymphocytes T γδ qui sont supposés produire de l'IFNγ (Figure 13). Après cette période, ce sont les lymphocytes T $CD4^+/CD8\alpha^+$ (équivalents aux lymphocytes T CD4 activés et mémoires des autres espèces) et les lymphocytes T $CD4^-/CD8\alpha^+\beta^+$ (équivalents aux lymphocytes T cytotoxiques) qui produisent majoritairement cette cytokine. Des expériences *in vivo* ont montré que le titre viral tissulaire et la fréquence des lymphocytes T producteurs

d'IFNγ n'étaient pas corrélés après une infection de type 2, soulevant l'idée que ces cellules ne sont pas impliquées dans la protection face au SDRPv (Xiao et al., 2004).

### *La réponse Th1/Th2*

En 2016, une étude a tenté d'étudier la balance Th1/Th2 face au SDRPv. En utilisant un virus de type 2 pour l'infection de moDC différenciées *in vitro*, les auteurs ont montré une induction de la cytokine IL-10 et une diminution des cytokines IL12p40, IFNγ et TNFα. Ce résultat semblerait indiquer un déséquilibre dans la balance Th1/Th2 après une infection de type 2 (Liu et al., 2016).

### *La réponse Th17*

Le SDRPv étant un co-facteur de nombreuses infections bactériennes, il est important de regarder l'impact de cette infection sur l'induction des lymphocytes Th17. Il a été montré qu'une infection par une souche de type 2 hautement pathogénique chinoise supprime la réponse Th17 dans le sang et le poumon *in vivo*, favorisant la susceptibilité à des infections bactériennes secondaires (Zhang et al., 2016).

### *La réponse T γδ*

Dans le cas du SDRPv, il est suggéré que les lymphocytes T γδ participent à la production précoce d'IFNγ avec les cellules NK mais le rôle de ces cellules face à cette infection est encore peu étudié (revue (Lunney et al., 2016)).

### *La réponse T reg*

Silva-Campa *et al.* ont montré que les Treg spécifiques du SDRPv peuvent être générés *in vitro* après stimulation des lymphocytes avec des moDC infectées par une souche de type 2 (Silva-Campa et al., 2009). Dans cette étude, l'activité régulatrice des lymphocytes est médiée par la production de TGF-β par les moDC différenciées et infectées *in vitro*. Dans un second papier, il a été montré que le type 1 à l'inverse du type 2 n'induit pas de Treg *in vitro* (Silva-Campa et al., 2010).

## 2. La réponse humorale

La réponse anticorps est détectée entre 7 et 9 jours après l'infection par le SDRPv. Ces anticorps sont majoritairement dirigés contre les protéines non-structurales et les protéines structurales N et GP5 (Figure 13). Ces anticorps sont présents en quantité importante dans le sérum mais sont non-neutralisants, c'est-à-dire qu'ils ne bloquent pas la capacité d'infection du virus (Yoon et al., 1994). Les anticorps neutralisants apparaissent après 1 mois d'infection. La cinétique de la réponse anticorps face au SDRPv se caractérise donc par une production rapide d'anticorps non-neutralisants avec peu d'affinité pour le pathogène ; suivie d'une apparition lente et faible d'anticorps neutralisants qui participent à la mise en place d'une protection. Néanmoins, les anticorps neutralisants seuls n'expliqueraient pas l'élimination complète du virus lors de l'infection. En effet, la virémie pourrait être contrôlée en absence d'anticorps neutralisants et les expériences de transferts nécessitent un fort titre d'anticorps transférés ( revue (Loving et al., 2015)).

Des études ont cependant montré la capacité de protection des anticorps neutralisants. En effet, le transfert d'anticorps neutralisants permet de prévenir l'apparition d'une virémie lors d'un *challenge* par une souche homologue (de même type) (Lopez et al., 2007; Osorio et al., 2002). Due au fort taux de mutation du virus, il était supposé que la protection face à des souches hétérologues était faible. Néanmoins, des sérums contenants des anticorps neutralisants avec une large capacité de reconnaissance d'antigènes (*broadly neutralizing antibodies*) ont été décrits (Robinson et al., 2015; Trible et al., 2015). Des expériences de transfert de sérum ont montré que les anticorps neutralisants pouvaient conférer une forte protection *in vivo*. En 2018, une expérience de transfert d'anticorps neutralisants *in vivo* a montré que ce transfert protégeait à 96% contre une infection homologue par le type 2 et à 87% par une infection hétérologue par le type 1 ; le transfert d'anticorps non-neutralisants n'ayant aucun effet (Robinson et al., 2018).

Concernant le retard dans l'apparition des anticorps neutralisants, Butler *et al.*, ont conduit des travaux sur l'activation des lymphocytes B lors d'infection de type 2 chez des porcelets axéniques. Ils ont montré qu'il existait une activation polyclonale des LB, une auto-immunité et une hypergammaglobulinémie (Lemke et al., 2004). Dans la différenciation des lymphocytes B $IgM^+$, les auteurs distinguent les LB naïfs ($CD2^+CD21^+$), les LB engagés ($CD2^-CD21^+$) et les LB effecteurs producteurs d'anticorps ($CD2^+CD21^-$). Ils montrent que le SDRPv

induit une forte réduction des LB naïfs concomitante avec une augmentation importante des LB effecteurs comparée aux virus de la grippe porcine et du circovirus porcin de type 2 (Sinkora et al., 2014). Ces travaux suggèrent que le SDRPv cause une activation non-spécifique des LB naïfs aboutissant à une différenciation massive en LB effecteurs non spécifiques du virus (Butler et al., 2007; Butler et al., 2008; Sinkora et al., 2014). Parmi les hypothèses mécanistiques, il est possible d'envisager une interaction entre le SDRPv et les cellules immunitaires ; soit directement avec les LB naïfs ; soit *via* une interaction avec les lymphocytes T *helper* ou les DC. Il est aussi envisageable que la différenciation des LB en réponse au SDRPv outrepasse la formation des centres germinatifs où ont lieu les étapes de sélection et de maturation des LB à l'origine de la production d'anticorps de fortes affinités.

D'autres mécanismes pourraient participer au retard dans l'apparition des anticorps neutralisants : l'existence d'un masquage des épitopes neutralisants par des glycosylations sur les protéines virales (Ansari et al., 2006; Das et al., 2011b; Chand et al., 2012), l'existence d'un épitope « leurre » en amont de l'épitope neutralisant sur la protéine GP5 (Ostrowski et al., 2002), une augmentation de l'internalisation du virus par les macrophages après association entre virus et anticorps (Yoon et al., 1996) ou une faible réponse immunitaire innée. Ainsi, la faible production d'IFNα décrite précédemment pourrait jouer un rôle essentiel dans le retard de la mise en place des réponses cellulaires et humorales efficaces (revue (Lunney et al., 2016)).

## C. Immunosuppression

Le SDRPv est fréquemment dépeint comme un virus immunosuppresseur. En effet, des co-infections avec les bactéries *Mycoplasma hyopneumoniae* ou *Bordetella bronchiseptica* ont montré une exacerbation potentielle des symptômes de pneumonie et une durée d'infection plus longue après une infection par le SDRPv (Thacker, 1999; Brockmeier et al., 2001).

Dans le cas du type 1, aucune évidence directe n'existe en faveur du caractère immunosuppressif du virus (Mateu & Diaz, 2008) mais une différence semble exister au sein des souches de type 1. Ainsi, les souches faiblement et hautement pathogènes ne semblent pas induire le même profil de réponse immunitaire. Les souches faiblement virulentes induiraient une réponse innée faible aboutissant à une virémie prolongée et une persistance de l'infection, alors que les souches très virulentes induiraient une forte inflammation et une élimination plus efficace (Morgan et al., 2013; Weesendorp et al., 2013). Ainsi, la comparaison des souches SU1-bel (type 1.3) et Lelystad (type 1.1) a dévoilé une plus forte réponse inflammatoire après

l'infection avec la souche SU1-bel (Amarilla et al., 2015). Cette forte réponse inflammatoire dans le type 1.3 est associée à des symptômes plus importants et une clairance virale plus rapide qu'avec le type 1.1. La clairance virale est inférieure à 20 jours pour le type 1.3 contre 30 jours pour le type 1.1 (Morgan et al., 2013).

Dans le cas du type 2, plusieurs études révèlent les propriétés immunosuppressives du virus, bien que d'autres ne le confirment pas (revue(Rahe & Murtaugh, 2017)). Le virus persiste chez les porcs sans induire une forte inflammation. Les modes d'action de cette immunosuppression ne sont pas totalement élucidés mais les connaissances restent plus importantes que pour le type 1. Les pistes actuelles sont en faveur d'une diminution de l'activité présentatrice des DC *via* une infection, d'une inhibition de l'activité cytotoxique des cellules *Natural Killers* et d'une forte induction de lymphocytes T régulateurs (Treg). Butler *et al.* ont démontré un impact de l'infection de type 2 sur la différenciation des lymphocytes B sans identifier les mécanismes impliqués (revue (Butler et al., 2014)). Certains mécanismes d'échappement du virus aux anticorps neutralisants ont été découverts comme la présence d'épitopes « leurres » (Ostrowski et al., 2002) ou la glycosylation de protéines virales masquant les épitopes neutralisants (Ansari et al., 2006).

Dans ce chapitre, il a été décrit que le SDRPv interagissait avec les réponses innée et adaptative du porc. Ainsi, la production d'interféron et les fonctionnalités des lymphocytes NK peuvent être impactées par l'infection. Les connaissances sur la réponse cellulaire et humorale face au SDRPv restent faibles. Le caractère immunosuppressif du virus reste débattu et semble varier selon la souche.

# Objectifs

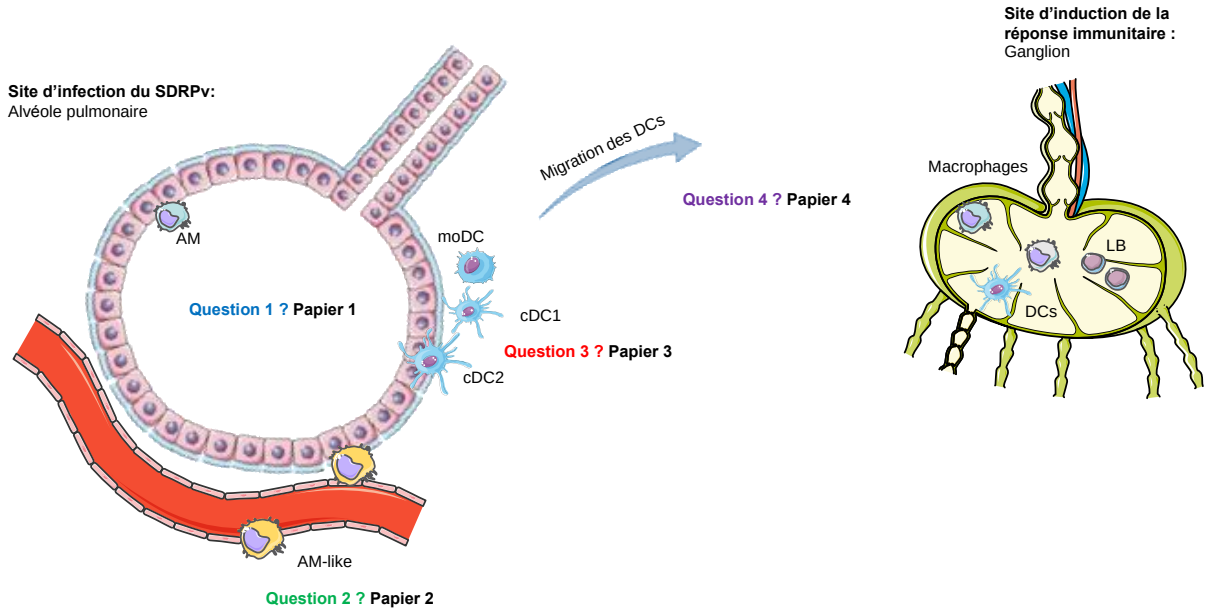
La variabilité des réponses immunitaires anti-SDRPv a fait émerger de nouvelles hypothèses sur l'interaction entre le SDRPv et son hôte.

Ainsi, l'existence de cibles cellulaires non identifiées est l'une des hypothèses les plus répandues. Les AM-like du poumon, cellules présentes dans le tissu et ayant un phénotype très proche des AM, sont l'une des cibles potentielles les plus probables. Alors qu'un consensus semble exister sur l'infection des DC différenciées *in vitro* par le type 2, aucune étude n'a jamais démontré une telle infection de DC primaires dans le cas des types 1 et 2. **Au vu de ces connaissances, nous avons décidé d'étudier l'infection des AM-like et des DC par différentes souches européennes** pour élucider si ces cellules peuvent être infectées *in vivo*. Un lien entre virulence et diversité des cellules infectées a été mis en évidence dans la muqueuse nasale en 2015 (Frydas et al., 2015). Nous tenterons de tester ce lien en utilisant différentes souches européennes lors de nos expériences d'infection.

Salguero et *al.* suggèrent une diversité entre les souches européennes dans la capacité d'induction de la réponse immunitaire (Salguero et al., 2015). **Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié l'interaction entre les cellules présentatrices d'antigènes et plusieurs souches européennes, puis l'impact de cette interaction sur la polarisation des lymphocytes T *helper*.** Quant au rôle de la réponse cellulaire dans une protection, il a été très peu étudié. **Afin de tester le rôle de cette réponse *in vivo*, nous avons étudié la protection conférée par les lymphocytes lors d'un transfert entre porcs D/D histocompatibles.**

La mise en place d'une réponse humorale neutralisante est retardée lors des infections de type 1 et 2. L'une des hypothèses proposées consiste en la prévention du développement d'un répertoire B adapté. Sachant que les macrophages des ganglions jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes B et que l'infection des macrophages ganglionnaires par le SDRPv a été très peu étudiée. **Nous avons décidé d'étudier le ganglion de porc et plus particulièrement les cellules immunitaires de type macrophages et lymphocytes B.** Après l'identification et la localisation de ces cellules, nous avons testé leur infection par le virus SDRPv et les conséquences possibles sur la réponse des lymphocytes B.

Problématisation des recherches de thèse




**Question 1 : Existe-t-il des cellules dendritiques dans les alvéoles pulmonaires chez le porc? Sont-elles différentes de leurs homologues du tissu pulmonaire?**

**Papier 1 :** *Broncho Alveolar Dendritic Cells and Macrophages Are Highly Similar to Their Interstitial Counterparts* (Plos One, 2016)

**Question 2 : Quelle est la localisation exacte des AM-like ? Sont-elles équivalentes aux *Pulmonary Intravascular Macrophages* ? Sont-elles infectables par le SDRPv?**

**Papier 2** : *Porcine Alveolar Macrophage-like cells are pro-inflammatory Pulmonary Intravascular Macrophages that produce large titers of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (Scientific Reports, 2018)

**Question 3 : Les cellules dendritiques du poumon sont-elles infectables par les souches de SDRPv européennes ? Les infections de type 1.1 et 1.3 impactent-elles différentiellement la fonctionnalité des DC, la polarisation de la réponse T *helper* et l'induction d'une réponse cellulaire ?**

**Papier 3 :** *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus type 1.3 Lena Triggers Conventional Dendritic Cells 1 Activation and T Helper 1 Immune Response without Infecting Dendritic Cells* (Frontiers in Immunology, accepté en septembre 2018)

**Question 4 : Peut-on identifier et localiser les cellules immunitaires dans le ganglion de porc ? Ces cellules sont-elles infectables par le SDRPv ?**

**Papier 4 :** *Identification, localization and interaction of macrophages and B cells in the inverted porcine lymph node at steady state and upon Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection* (Soumission prévue en octobre 2018)

## Papier n°1 : Les cellules dendritiques et les macrophages du lavage broncho-alvéolaire sont similaires à leurs homologues du tissu pulmonaire

### *Introduction des travaux*

Dans certains modèles, les expérimentateurs n'ont pas accès aux DC du tissu pulmonaire. Pour pallier à cette problématique, les DC peuvent être collectées par lavage broncho-alvéolaire (BAL). Cette technique faiblement invasive permet par exemple la réalisation de prélèvements chez l'Homme. Néanmoins, à notre connaissance aucune comparaison entre DC du BAL et DC du tissu pulmonaire n'a jamais été réalisée. Le modèle porcin donne accès aux DC du BAL et du tissu pulmonaire pour un même individu. De plus, il a été montré que les DC porcines semblaient plus proches des DC humaines que murines (Maisonnasse et al., 2016). Nous avons donc décidé d'utiliser ce modèle pour comparer les DC de ces 2 environnements afin de déceler d'éventuelles différences liées à l'environnement des DC. En 2015, mon équipe a découvert des macrophages présents dans le tissu pulmonaire avec un phénotype proche des macrophages alvéolaires (AM). Ces macrophages ont été dénommés AM-like afin d'illustrer cette ressemblance. Dans ce papier, la comparaison de ces 2 populations est approfondie.

Pour résumer cette publication, la numération des populations entre BAL et tissu pulmonaire a permis de révéler que le nombre absolu d'AM-like sur un lobe pulmonaire était 10 fois moins important que le nombre d'AM. La comparaison du profil transcriptomique de 10 gènes choisis pour leur différence d'expression entre BAL et tissu n'a révélé aucune différence entre les DC du BAL et du tissu. De plus, cette même comparaison entre AM et AM-like n'a pas révélé de différence significative entre les 2 populations.

Cet article a été publié dans la revue Plos One, le 19 décembre 2016.

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

# Broncho Alveolar Dendritic Cells and Macrophages Are Highly Similar to Their Interstitial Counterparts

**Pauline Maisonnasse, Elise Bordet, Edwige Bouguyon, Nicolas Bertho***

Virologie et Immunologie Moléculaires, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France

* nicolas.bertho@jouy.inra.fr

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

**Citation:** Maisonnasse P, Bordet E, Bouguyon E, Bertho N (2016) Broncho Alveolar Dendritic Cells and Macrophages Are Highly Similar to Their Interstitial Counterparts. PLoS ONE 11(12): e0167315. doi:10.1371/journal.pone.0167315

**Editor:** Heinz Fehrenbach, Forschungszentrum Borstel Leibniz-Zentrum fur Medizin und Biowissenschaften, GERMANY

**Received:** June 27, 2016

**Accepted:** November 13, 2016

**Published:** December 19, 2016

**Copyright:** © 2016 Maisonnasse et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** Data are available from figshare (DOI: 10.6084/m9.figshare.4036257).

**Funding:** Dr. Pauline Maisonnasse was supported by Fondation du soufflé. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

In human medicine, bronchoalveolar lavage is the main non-traumatic procedure allowing an insight into the respiratory Dendritic Cells (DC) and Macrophages populations. However, it has never been demonstrated in a relevant model that alveolar DC subpopulations were comparable to their interstitial counterparts. In a precedent work we observed that respiratory pig DC and Macrophages were more similar to the human ones than to the mouse ones. In the present work, thanks to our animal model, we were able to collect the rare bronchoalveolar DC and compare them to their interstitial counterparts. We observed that DC presented very similar gene-expression patterns in the alveolar and interstitial compartments, validating the study of human bronchoalveolar DC as surrogate of their interstitium counterparts.

## Introduction

Dendritic Cells (DC) and Macrophages are an essential part of the respiratory immune system. Their roles in the development and the resolution of respiratory infections are widely studied. They are indeed involved in sensing foreign antigens, controlling inflammation, and initiating the adaptive immune responses.

These myeloid cells can be subdivided in 5 different subsets that we named according to the nomenclature principle proposed by Guilliams *et al.* [1], and used by ourselves in a previous study [2]. This nomenclature is based on the origin and the function of the myeloid cells. Although not officially accepted, it offers the advantage to assign one single name per DC/Macrophages subpopulation for all the species, thus greatly facilitating trans-species comparisons: FLT3-dependent conventional DC (cDC) being Sirpα negative or low and expressing high levels of XCR1 are named cDC1 (BDCA3$^{pos}$ cDC and CD103$^{pos}$ cDC in human and mouse respectively), whereas the Sirpα$^{high}$/CD11b$^{pos}$ cDC are named cDC2 (BDCA1$^{pos}$ and CD11b$^{pos}$ in human and mouse). Monocyte-derived DC (moDC) differentiating upon inflammation are named moDC, whereas monocytes differentiating in Macrophages are called moMacro. Finally, Macrophages originating from embryonic precursors settled in the lung before birth [3, 4] are called Alveolar Macrophages (AM).

Many lung pathologies involve an uncontrolled inflammation. Murine moDC, recruited through the CCR2/CCL2 interaction, are involved in the induction of lung pathological inflammation, for example during an Influenza infection [5]. Human cDC2 accumulation has been observed in lung and airway epithelium during Th2 inflammation-associated asthma [6], while murine cDC2 [7] and moDC [8] accumulated in the lung parenchyma. On the other hand, murine interstitial Macrophages, *bona fide* moMacro, strongly down-modulate the allergic immune response [9].

Those DC/Macrophages populations are thus of great interest in the study of respiratory pathologies, either to boost the immune response or to down-modulate the pathological inflammation.

Porcine and human respiratory systems share several anatomical, histological, physiological, and biochemical elements [10]. Pig is being developed as a model for respiratory pathologies such as Influenza infections [11] or cystic fibrosis [12]. Finally, our team recently characterized porcine DC/Macrophages in lung tissue and tracheal epithelium, and showed their similarities with their human counterparts [2].

In the case of human patients, only the Bronchoalveolar Lavages (BAL) cells are easily available. However, to our knowledge, it has never been formally shown that BAL-collected DC and Macrophages were similar to their parenchymal counterparts.

In order to validate human studies on BAL DC and Macrophages, we though to compare BAL and parenchymal DC/Macrophages in swine.

## Methods

### Animals, in vivo infections, and tissue collection

Tissue samples were obtained from 5- to 7-month-old Large White conventionally bred sows from UEPAO, Tours, France. Animals were euthanized for the normal course of livestock management, in compliance with European directives and with French veterinary authorities' agreements (agreement number 3717501). They were anesthetized by electro-narcosis, then bled before the collection of the lung and the realization of the BAL. Cells were collected as previously described (Maisonnasse et al. 2015). Briefly, a BAL was performed twice in PBS supplemented with 2mM EDTA (PBS/EDTA) to collect AM. Then, the tissue was dissected, minced and incubated in non-culture treated Petri dishes for two hours at 37°C in complete RPMI, containing 2 mg/ml collagenase D (Roche), 1 mg/ml dispase (InVitrogen) and 0.1 mg/ml Dnase I (Roche). Cells were passed through 40 μm strainers, and red blood cells lysed. Then, cells were washed with PBS/EDTA, counted and step-frozen in FCS plus 10% DMSO (Sigma-Aldrich).

### Flow cytometry analysis and cell sorting

The following Antibodies (Abs) were used: Sirpα/CD172a (74-22-15a) and MHC-II (MSA3) from Monoclonal Antibodies Center Washington State University; CD163 (2A10/11) from AbD-Serotec; isotype-specific secondary reagents coupled to Alexa 488, PE or Alexa 647 from Invitrogen. Cell surface stainings were performed as previously described [2]. Briefly, cells were stained in PBS/EDTA supplemented with 5% horse serum and 5% swine serum for 30 minutes on ice and washed twice with PBS/EDTA between labeling. Samples were acquired on a Fortessa (BD-Bioscience) or sorted on a MoFlo ASTRIOS (Beckman-Coulter). For sorting, preparations were enriched in DC/Macrophages by gradient [13] (Optiprep; Nycomed Pharma) and dead cells were excluded by Dapi staining (Sigma-Aldrich). Acquired data were analyzed using FlowJo software (version X.0.6).

## RNA extraction

Total RNA from sorted cells were extracted using the Arcturus PicoPure RNA Isolation kit according to the manufacturer's instructions. Contaminating genomic DNA was removed using a Qiagen RNase free DNase set.

## Real-time quantitative PCR (qPCR)

RNA was reverse transcribed using random hexamers and the Multiscribe reverse transcriptase (Life Technologies). qPCR were performed as previously described [2]. Briefly, reactions were carried out with 300 nM primers in a final reaction volume of 25 μl of 1 X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). PCR cycling conditions were 95˚C for 10 min, linked to 40 cycles of 95˚C for 15 s and 60˚C for 1 min. Real-time qPCR data were collected by the Mastercycler® e0p realplex-Eppendorf system and 2−ΔCt calculations for the relative expression of the different genes (arbitrary units) were performed with the Realplex software using ovRPS24 (ovine Ribosomal Protein S24) as reference gene. This gene has been carefully chosen after a transcriptomic screen (data not shown). RPS24 expression being more stable than HPRT, RPL19 and GAPDH expressions, when tested on the different DC/Macrophages populations in different animals, and upon influenza infection.

The primers used were: ovRPS24 (F: AAGGAACGCAAGAACAGAATGAA, R: TTTGCCAGCACCAACGTTG); FLT3 (F: TGTTCACGCTGAATATAAGAAGGAA, R: GGAGCAGGAAGCCTGACTTG); XCR1 (F: CGATGCCGTCTTCCACAAG, R: GGAACCACTGGCGTTCTGA); FCεR1α (F: AATTTACAGACCCACAGCCTAGCT, R: TGCTATCGCAGATGTTTCTTGAG); CD103 (F: GATGCGGAACATCTATGAGAAGTG, R: CTGGATGACGCTCCCGTATT); cKit (F: TGGGCTCGAGAAGTCAAGTATTT, R: ATGCCCGGAGAGCATTTTT); CCR2 (F: ACACGCTTTCCCGGTTCA, R: CCCTTGATATTCATTGTAAGCAGAGA); CX3CR1 (F: CGTGGCCCTGGGAACTG, R: CGAGGCCAAAGGCAAAAA); CSF1R (F: TGAACGACTCCAACTACATTGTCA, R: TGTAGACGCAGTCGAAGATGCT); MerTK (F: CCGAACTCTGTAATCGCTTCTTG, R: TGCACTTCCGCCGTGACTA); MAFB (F: TGCGTTCTTTAGACCAATATGTTATGT, R: CACCAATAACTCGCCCGCTAT).

## Statistical analysis

All data were analyzed using the GraphPadPrism v5.0 statistical software package (GraphPad Software, La Jolla, CA). Statistical tests applied to each data set are indicated in the relevant figure legend.

## Results and Discussion

We segregated DC and Macrophages using a staining and gating strategy as described in Fig 1A and 1B, according to our previous work [2], in which we precisely defined phenotypically and functionally these different parenchymal subpopulations as well as the alveolar macrophages. In short, we stained parenchymal lung cells or BAL cells for MHC-II, CD163 and Sirpα. Among parenchymal MHC-II$^{high}$ cells, Sirpα$^{high}$/CD163$^{high}$ cells were defined as AM-like cells, Sirpα$^{interm}$/CD163$^{interm}$ cells were moMacro, Sirpα$^{high}$/CD163$^{low}$ cells were moDC, Sirpα$^{high}$/CD163$^{neg}$ cells were cDC2 and Sirpα$^{neg}$/CD163$^{neg}$ cells were cDC1. In the BAL, because of their strong prevalence, we previously described the only Sirpα$^{high}$/CD163$^{high}$ AM population, although rare cells could be observed presenting phenotypes related to the moMacro, moDC, cDC1 and cDC2 parenchymal cells (Fig 1B). Here, we first assessed the number of each DC/Macrophages populations in the parenchyma and BAL of 4 pigs. In order to compare

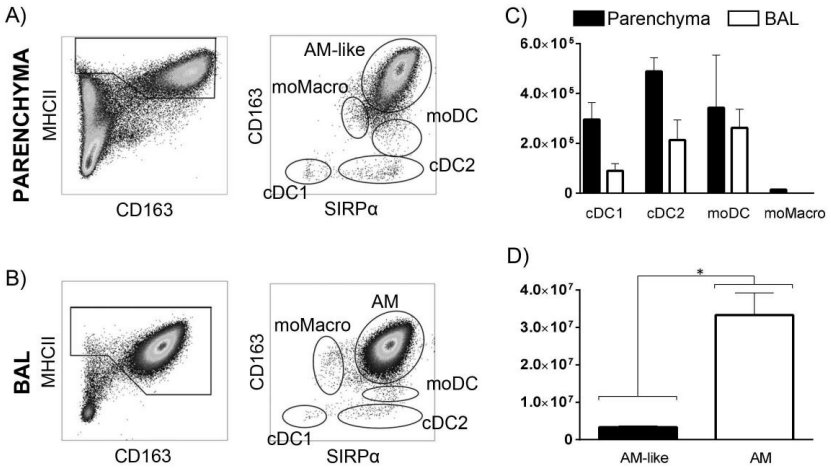



**Fig 1. Bronchoalveolar lavage (BAL) and lung interstitial (parenchyma) cells were obtained from the diaphragmatic lobe (A and B) or the right cardiac lobe (C and D) and stained for multi-color flow cytometry.** (A and B) gating strategy used for the count and cell sorting of each subpopulation as previously described [2]. (C and D) Absolute number of each subset among total MHCII$^{high}$ cells was assessed in parenchyma and BAL (n = 4). cDC = conventional Dendritic Cells, moDC = monocyte-derived DC, moMacro = monocyte-derived Macrophages, AM = alveolar Macrophages. Statistic signs *: P<0.01, **: P<0.001 with a Mann-Whitney test.

doi:10.1371/journal.pone.0167315.g001

the absolute number of cells in the alveoli and tissue, we worked on the right cardiac lobe which is small enough to collect the whole tissue.

It appeared that cDC2 and cDC1 were 2 and 3 times less numerous in the alveoli than in the tissue (Fig 1C), with 213.10$^3$ cDC2 and 89.10$^3$ cDC1 in the BAL to be compared with 489.10$^3$ cDC2 and 295.10$^3$ cDC1 in the parenchyma. In the BAL, Sirpα$^{interm}$/CD163$^{interm}$ cells, first identified as moMacro, presented a gene expression pattern identical to AM (data not shown), so they were pooled with the Sirpα$^{high}$/CD163$^{high}$ AM population. Thus, moMacro could not be identified in BAL, probably due to their absence or their very low proportion compared with AM. Indeed, in the parenchyma, not more than 14.10$^3$ moMacro cells/lobe were counted. The moDC were equally present in BAL and parenchyma (respectively 262.10$^3$ and 343.10$^3$ per lobe). However, the main MHCII$^{high}$ populations in the lung were AM (33.10$^6$ cells per lobe) and AM-like cells (3.10$^6$ cells per lobe), the latter being 10 times less represented than AM (Fig 1D). AM-like cells still represented the main population in the interstitium and were at least 5 times more numerous than the other 4 populations we observed there.

The BAL cells were then sorted by flow cytometry and the transcriptomic expressions of 10 genes previously identified as differentially expressed in these populations by us [2, 14] and others [4, 15, 16] were measured by RT-qPCR (Fig 2A). In order to easily compare those results with those we previously obtained, we depicted previously published data from parenchymal cells [2] as closed symbols in Fig 2A and as the "PAR" columns in the heat map (Fig 2B) we designed to summarize the RT-qPCR data. The two cDC populations were highly similar between BAL and tissue, expressing both high levels of Flt3, whereas cDC1 specifically expressed XCR1 and cDC2 specifically expressed FCεR1α. BAL moDC clearly expressed the monocytic genes CSF1R, MerTK and MAFB, proving their belonging to the moDC subset. The main differences, although not significant, with their interstitial counterpart resided in their higher expressions of CCR2 and CX3CR1. Finally, and as we had previously shown, AM-like cells were highly similar to AM. They had a strong expression of the Macrophage-associated gene MerTK, and low expressions of genes which are specific of hematopoietic cells such

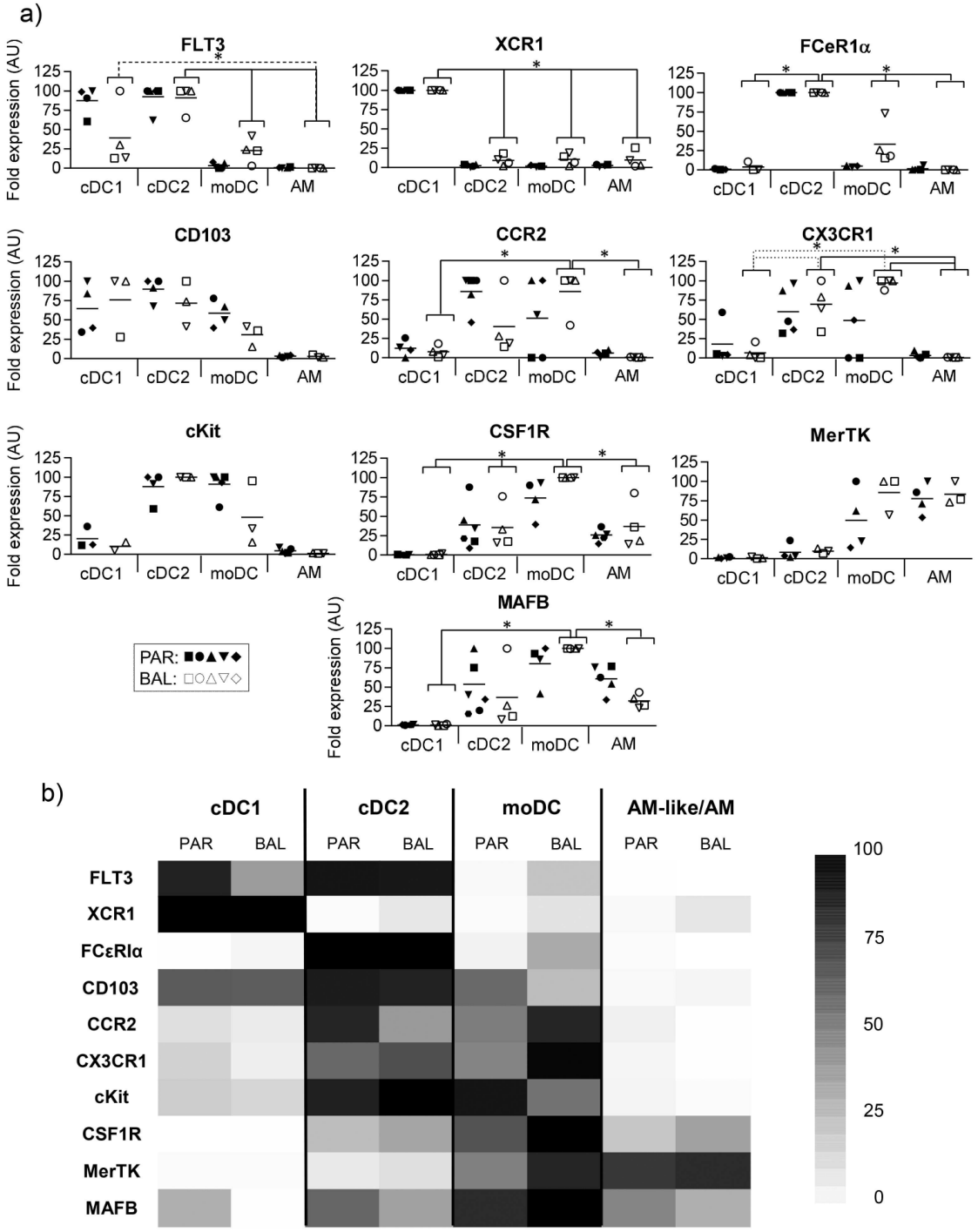



**Fig 2.** (A) The different subsets from BAL were sorted by flow cytometry. mRNA expression levels of 10 genes were assessed by RT-qPCR. For each gene, data were normalized to the reference gene RPS24 (Ribosomal Protein S24) expression and presented as relative expression (arbitrary units (AU)): for each animal, the population with the highest expression was considered as 100 and the other populations were normalized to it. Each symbol represents one animal. For the sake of an easier comparison between parenchymal (closed symbols) and BAL (open symbols) populations, parenchymal cells data (closed symbols), previously published in [2] were integrated in this figure. B) Heat map depicting the results from 2A. cDC = conventional Dendritic

Cells, moDC = monocyte-derived DC, moMacro = monocyte-derived Macrophages, AM = alveolar Macrophages. Statistic signs *: P<0.01, **: P<0.001 with Student t-test.

doi:10.1371/journal.pone.0167315.g002

as cKit, CCR2 or CX3CR1, in agreement with an origin independent from the bone marrow. Interestingly, only one gene expression appeared different, although not significant, between AM and AM-like cells, AM-like cells expressing more MAFB than AM.

To conclude, we showed here that in the swine model, BAL DC/Macrophages appear similar to their interstitial counterparts, with a probable common origin and similar differentiation patterns. However, their establishment in different lung compartment may significantly influence their functions, which still need to be investigated.

## Acknowledgments

We would like to thank Christophe Staub, the UEPAO staff and especially Jean-Philippe Dubois for their help in samples collection.

We thank Mickael Bourge from I2BC (CNRS, Gif-sur-Yvette, France), for the help in cell sorting.

We thank Isabelle Schwartz-Cornil for critical reading of the manuscript.

## Author Contributions

**Conceptualization:** NB.

**Formal analysis:** PM E Bordet.

**Funding acquisition:** NB PM.

**Investigation:** PM E Bordet E Bouguyon.

**Methodology:** NB.

**Project administration:** NB.

**Resources:** NB PM.

**Supervision:** NB.

**Validation:** NB PM.

**Visualization:** PM NB.

**Writing – original draft:** PM NB.

**Writing – review & editing:** NB PM.

## References

1. Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. Nature reviews Immunology. 2014; 14 (8):571–8. doi: 10.1038/nri3712 PMID: 25033907
2. Maisonnasse P, Bouguyon E, Piton G, Ezquerra A, Urien C, Deloizy C, et al. The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. Mucosal Immunol. 2015.
3. Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. J Exp Med. 2013; 210(10):1977–92. doi: 10.1084/jem.20131199 PMID: 24043763

4. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. Science. 2012; 336(6077):86–90. doi: 10.1126/science.1219179 PMID: 22442384
5. Aldridge JR Jr., Moseley CE, Boltz DA, Negovetich NJ, Reynolds C, Franks J, et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106(13):5306–11. Epub 2009/03/13. doi: 10.1073/pnas.0900655106 PMID: 19279209
6. Greer AM, Matthay MA, Kukreja J, Bhakta NR, Nguyen CP, Wolters PJ, et al. Accumulation of BDCA1 (+) dendritic cells in interstitial fibrotic lung diseases and Th2-high asthma. PLoS One. 2014; 9(6): e99084. doi: 10.1371/journal.pone.0099084 PMID: 24915147
7. Dong J, Wong CK, Cai Z, Jiao D, Chu M, Lam CW. Amelioration of allergic airway inflammation in mice by regulatory IL-35 through dampening inflammatory dendritic cells. Allergy. 2015; 70(8):921–32. doi: 10.1111/all.12631 PMID: 25869299
8. Plantinga M, Guilliams M, Vanheerswynghels M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, et al. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. Immunity. 2013; 38(2):322–35. Epub 2013/01/29. doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.016 PMID: 23352232
9. Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, Henry E, et al. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. The Journal of clinical investigation. 2009; 119(12):3723–38. doi: 10.1172/JCI39717 PMID: 19907079
10. Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerdts V. The pig: a model for human infectious diseases. Trends Microbiol. 2012; 20(1):50–7. Epub 2011/12/14. doi: 10.1016/j.tim.2011.11.002 PMID: 22153753
11. Zhu H, Wang D, Kelvin DJ, Li L, Zheng Z, Yoon SW, et al. Infectivity, transmission, and pathology of human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs. Science. 2013; 341(6142):183–6. Epub 2013/05/25. doi: 10.1126/science.1239844 PMID: 23704376
12. Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. Science. 2008; 321(5897):1837–41. Epub 2008/09/27. doi: 10.1126/science.1163600 PMID: 18818360
13. Marquet F, Bonneau M, Pascale F, Urien C, Kang C, Schwartz-Cornil I, et al. Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. PLoS One. 2011; 6(1):e16320. Epub 2011/02/08. doi: 10.1371/journal.pone.0016320 PMID: 21298011
14. Vu Manh TP, Elhmouzi-Younes J, Urien C, Ruscanu S, Jouneau L, Bourge M, et al. Defining Mononuclear Phagocyte Subset Homology Across Several Distant Warm-Blooded Vertebrates Through Comparative Transcriptomics. Frontiers in immunology. 2015; 6:299. doi: 10.3389/fimmu.2015.00299 PMID: 26150816
15. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. Nature immunology. 2012; 13(11):1118–28. doi: 10.1038/ni.2419 PMID: 23023392
16. Miller JC, Brown BD, Shay T, Gautier EL, Jojic V, Cohain A, et al. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. Nature immunology. 2012; 13(9):888–99. doi: 10.1038/ni.2370 PMID: 22797772

### *Discussion complémentaire*

Dans ce papier, nous démontrons que l'expression de 10 gènes est identique entre les DC du BAL et du tissu pulmonaire. Le choix de ces 10 gènes repose sur leur expression différentielle entre les sous-types de DC et de macrophages lors de précédents travaux (Maisonnasse et al., 2016). Il ressort de cette étude que les DC du BAL sont un bon modèle pour étudier les DC du parenchyme car leur profil d'expression est proche. Des études fonctionnelles seraient nécessaires pour évaluer si les DC se comportent de manière identique selon leur localisation. En effet, l'environnement des cellules joue un rôle primordial dans leur fonctionnalité. Dans le BAL, les cellules sont au contact du surfactant. Le surfactant est un tensioactif composé de phospholipides et de protéines. Certaines protéines du surfactant peuvent impacter les fonctionnalités des cellules immunitaires notamment en augmentant la phagocytose des cellules apoptotiques ou des pathogènes et la production de cytokines ou d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (revue (Pastva et al., 2007)). La présence du surfactant *in vivo* rend très difficile la modélisation d'un tel environnement *in vitro* pour les cellules issues du lavage broncho-alvéolaire.

Lorsque nous collectons des échantillons du poumon, les DC du BAL sont 2 à 3 fois moins nombreuses que leurs homologues pulmonaires. Malgré leur faible représentation, leur intérêt dans nos travaux est très important. En effet, les DC du BAL ne subissent pas de digestion lors de leur collection. Dans la suite de nos travaux, nous allons travailler sur les capacités d'infection et les fonctionnalités des DC. En analysant systématiquement, les DC de ces deux localisations différentes, cela nous permettra de nous assurer que la technique de collection des cellules (principalement la digestion tissulaire) n'a pas d'impact sur nos résultats.

Dans ces travaux, le gène *MAFB* semble différentiellement exprimé entre AM et AM-like. Dans la suite de nos travaux, nous allons continuer la comparaison de ces macrophages, afin d'élucider le rôle et la localisation exacte des AM-like. En effet, les AM-like pourraient correspondre à des macrophages décrits dans les années 90, nommés *Pulmonary Intravascular Macrophages* (PIM).

De manière étonnante, les moMacro décrits dans les travaux précédents de l'équipe n'ont pas été identifiés dans le BAL. Ce fait s'explique peut-être simplement par un nombre trop faible de cellules et une difficulté à les distinguer des AM et AM-like. Néanmoins, durant cette thèse, il s'est avéré que la collection et l'étude de ces cellules étaient inconstantes et

incompatibles avec d'autres stratégies de tri cellulaire. Pour ces raisons, l'étude des moMacro dans le poumon a été abandonnée dans l'ensemble des travaux suivants.

## Papier n°2 : les AM-like correspondent aux *Pulmonary Intravascular Macrophages* et sont susceptibles à l'infection par le SDRPv

### *Introduction des travaux*

Dans cet article, nous nous focalisons sur les AM-like décrits dans les travaux précédents. L'une de nos hypothèses de travail est que les AM-like pourraient correspondre aux *Pulmonary Intravascular Macrophages* (PIM) déjà décrits par d'autres équipes chez le porc mais très rarement isolés. Afin d'étudier cette hypothèse, nous allons utiliser des bactéries fluorescentes afin de tester si les AM-like sont en position intravasculaire ou non.

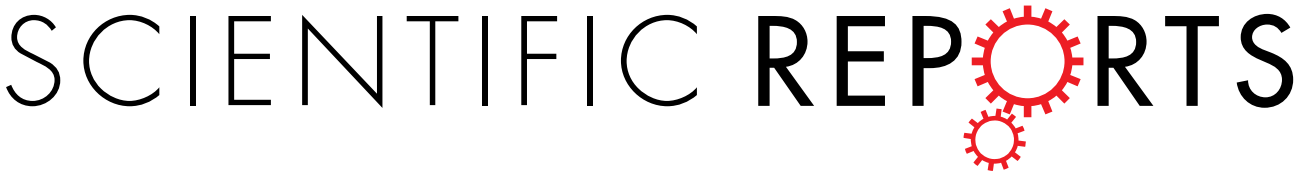
Dans le cas de l'infection SDRPv, les AM sont la cible cellulaire principale du virus. Au vu de la ressemblance phénotypique entre AM et AM-like notamment pour l'expression du marqueur CD163, l'infection des AM-like par le SDRPv (noté PRRSV en anglais) semble probable. Dans ce papier, nous testons l'infection *in vitro* et *in vivo* des AM-like par le SDRPv, ainsi que la production de cytokines par ces cellules après infection.

La forte ressemblance entre AM et AM-like soulève la question d'une origine commune de ces cellules. Il a été montré que les AM sont résidentes dans le tissu, capables de s'auto-renouveler et ont une origine embryonnaire. Afin d'adresser cette question, l'étude par RT-qPCR de l'expression de gènes généralement associés à l'origine embryonnaire a été conduite dans les AM-like.

Pour résumer ces travaux, l'utilisation de bactéries fluorescentes a révélé la localisation intravasculaire des AM-like et le fait que les AM-like sont bien des PIM. Des infections *in vitro* et *in vivo* par le SDRPv ont révélé une forte capacité d'infection des AM-like/PIM, égale à celle des AM et une production de cytokines inflammatoires par ces cellules en réponse à l'infection. La comparaison de l'expression de gènes associés à l'origine embryonnaire des AM/PIM a demontré un profil fortement similaire entre AM et AM-like/PIM, en accord avec l'hypothèse d'une origine embryonnaire des AM-like/PIM.

Cet article a été accepté dans Scientific Reports, le 5 juillet 2018.

www.nature.com/scientificreports



OPEN

Received: 14 February 2018
Accepted: 13 June 2018
Published online: 05 July 2018

# Porcine Alveolar Macrophage-like cells are pro-inflammatory Pulmonary Intravascular Macrophages that produce large titers of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

Elise Bordet[1], Pauline Maisonnasse[1], Patricia Renson[2,3,4], Edwige Bouguyon[1], Elisa Crisci[5,6], Mathieu Tiret[5], Delphyne Descamps[1], Cindy Bernelin-Cottet[1], Céline Urien[1], François Lefèvre[1], Luc Jouneau[1], Olivier Bourry[2,3], Jean-Jacques Leplat[5], Isabelle Schwartz-Cornil[1] & Nicolas Bertho[1]

**Lung inflammation is frequently involved in respiratory conditions and it is strongly controlled by mononuclear phagocytes (MNP). We previously studied porcine lung MNP and described a new population of cells presenting all the features of alveolar macrophages (AM) except for their parenchymal location, that we named AM-like cells. Herein we showed that AM-like cells are macrophages phagocytosing blood-borne particles, in agreement with a pulmonary intravascular macrophages (PIM) identity. PIM have been described microscopically long time ago in species from the *Laurasiatheria* superorder such as bovine, swine, cats or cetaceans. We observed that PIM were more inflammatory than AM upon infection with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), a major swine pathogen. Moreover, whereas PRRSV was thought to mainly target AM, we observed that PIM were a major producer of virus. The PIM infection was more correlated with viremia *in vivo* than AM infection. Finally like AM, PIM-expressed genes were characteristic of an embryonic monocyte-derived macrophage population, whose turnover is independent of bone marrow-derived hematopoietic precursors. This last observation raised the interesting possibility that AM and PIM originate from the same lung precursor.**

Respiratory infections are one of the major sources of disease in swine husbandry, leading to economic losses in the pig industry. Since the aetiology of respiratory diseases is multifactorial, the term porcine respiratory disease complex (PRDC) is often used[1]. One of the main pathogens at the root of PRDC is the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), an enveloped, positive-stranded RNA virus of the *Arteriviridae* family. Indeed, PRRSV presents long-term infections due to its capacities to alter the immune response, a property that facilitates bacterial and viral superinfections. PRRSV main cellular target is thought to be alveolar macrophages

[1]Virologie et Immunologie Moléculaires UR892, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 78352, Jouy-en-Josas, France. [2]Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzane, Unité Virologie et Immunologie Porcines, Zoopôle, BP53, 22440, Ploufragan, France. [3]Université Bretagne Loire, Cité internationale, 1 place Paul Ricœur, CS 54417, 35044, Rennes, France. [4]Union des Groupements de Producteurs de Viande de Bretagne (UGPVB), 104 rue Eugène Pottier, 35065, Rennes, cedex, France. [5]Génétique Animale et Biologie, Intégrative (GABI) UMR 1313, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 78352, Jouy-en-Josas, France. [6]Department of Population Health and Pathobiology, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, 1060 William Moore Drive, 27607, Raleigh, NC, USA. Elise Bordet and Pauline Maisonnasse contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.B. (email: nicolas.bertho@inra.fr)

(AM), although virus is present in the blood and can be detected up to several months post infection in the secondary lymphoid organs (for review see[2]).

In order to further develop the pig as a biomedical model[3], and to better deal with PRRSV infection as well as with PRDC, a better understanding of the immune environment of the pig lung is needed. We previously described dendritic cells (DC) and macrophages (MΦ) present in the porcine respiratory tract, such as conventional DC1 (cDC1), cDC2, monocyte-derived DC (moDC), and monocyte-derived MΦ (moMΦ) as well as AM[4]. As previously described in murine and human respiratory tracts, we observed that DC were present both in the parenchyma and in the alveoli, although at a lower level in the alveoli[5]. Surprisingly, we also observed the presence of macrophage-like cells with a phenotype highly similar to AM but that were not located in the alveoli. We thus named these parenchymal AM, AM-like cells. Despite thorough studies, this cell type has not been previously observed at steady state in mice[6] or in non-human primates[7]. Interestingly 30 years ago, using electron microscopy and gold or iron oxide beads, a pulmonary macrophage population embedded in the endothelium wall of lung capillaries, called Pulmonary Intravascular Macrophages (PIM, for review see[8,9]) has been described in animals belonging to the *Laurasiatheria* superorder, for instance cattle, sheep, swine, horses, cats and odontoceti cetaceans[10–14]. No PIM were constitutively observed in monkeys, rabbits, mice or rats from the *Euarchontoglires* superorder[9,14], which includes humans. PIM presented strong phagocytic capacities of blood born particles and their role in *Laurasiatheria* is thought to be similar to Kupffer cells in *Euarchontoglires*. Indeed PIM in the lung, as well as Kupffer cells in the liver are macrophages involved in the clearance of blood-borne particles[15]. Moreover, depletion studies of blood mononuclear phagocytes (MNP) in calves, horses and pigs have indicated that PIM might contribute to the acute lung inflammation induced by blood-borne pathogens by secreting pro-inflammatory cytokines such as TNFα, interleukin-8 (IL-8) and IL-6[16–20]. Despite these interesting early studies and the growing economic burden of PRDC in the porcine industry, PIM have rarely been considered in pig respiratory diseases during the last 10 years, most probably due to the difficulties to isolate and characterize them phenotypically and functionally.

Herein, we demonstrate in swine that the AM-like population represents pro-inflammatory PIM with the capacity to phagocytose blood-borne particles. We show that PIM present features of self-renewable, tissue-specific macrophages from embryonic-monocyte origin and that PIM are infected and produce large amount of PRRSV viral particles *in vitro* and *in vivo*.

## Results

**AM-like cells are Pulmonary Intravascular Macrophages (PIM).** AM-like cells represented the second-most abundant population of lung MNP after AM, being 10 times less represented than AM, but at least 5 times more numerous than cDC1, cDC2 or moDC[5]. In a first description of AM-like cells, we demonstrated that these cells were not located in the alveoli, and that our broncho-alveolar lavage procedure avoids the contamination of the parenchymal cell preparation by AM[4]. However, we were uncertain whether AM-like cells were localized in the lung interstitium or on the endothelial wall, in contact with the vascular lumen as described for PIM. Since PIM have been described as highly phagocytic cells[20], an experiment was devised in order to label phagocytic cells having access to blood-borne particles using FITC-labelled *pseudomonas* bacteria injected in the jugular vein. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), broncho-alveolar lavage (BAL) and parenchyma were collected 10 minutes post-bacterial injection, cell suspensions were recovered and stained for cDC1, cDC2, moDC and AM/AM-like discrimination as previously described[4] (Fig. 1a). In the parenchyma, 19% +/− 4% of AM-like cells presented a clear phagocytosis of FITC-labelled bacteria, no cDC1 and few cDC2 were FITC-stained. Interestingly, moDC presented a highly variable FITC staining, from 2% to 18% (mean 13% +/− 5%). In the BAL, no FITC staining either of AM (Fig. 1a,b) or of BAL DC (data not shown) was observed. In order to identify blood-circulating cells that might phagocytose bacteria and contaminate the parenchymal preparation, the same gating as for parenchymal cells was applied for PBMC. No events were observed that could correspond to AM-like cells (empty gate 4 in Fig. 1a), proving that AM-like cells were not blood circulating cells. Conversely, the PBMC gates 2 and 3 (Fig. 1a), corresponding respectively to cDC2 and moDC in the parenchymal gating, presented a strong phagocytosis of bacteria, since around 50% of these two cell types presented FITC staining. Thus, the FITC staining of parenchymal cDC2 and moDC might mostly be due to blood circulating cell contamination of the parenchyma. In order to demonstrate that the lower staining of AM, cDC1 and cDC2 was not due to an intrinsic defect in bacterial phagocytosis, BAL cells were incubated *in vitro* with FITC-stained pseudomonas. All the DC/Macrophages subtypes (cDC1, cDC2, moDC and AM) presented more than 45% bacteria phagocytosis (data not shown), in agreement with similar capacities of these cells to phagocyte bacteria, provided that they enter in contact with the pathogen.

Thus, AM-like cells are the only parenchymal residing MNP population consistently phagocytosing blood bacteria. Although only 20% of the AM-like cells appeared FITC positive, we consider that the 3 to 4 hours needed for MNP extraction from lung tissue allowed a majority of PIM that had phagocytosed bacteria to quench the acid-sensitive FITC, eventually exhibiting no staining. Alternatively, PIM might be able to move across the blood barrier and locate temporarily in the interstitium, losing their access to blood. We then proceeded to tissue staining and confocal imaging in order to visualize blood-borne bacterial phagocytosis *in situ*. We observed the localization of FITC-stained bacteria inside $CD163^{high}$/$MHC\text{-}II^{high}$ cells (AM-like cells) in the parenchyma, in ve-Cadherin (a blood vessel specific marker[21]) rich area (Fig. 1c). Altogether, we show here that AM-like cells are *bona fide* PIM.

**PIM/AM-like cells share with AM differential expression of key chemokine receptors and transcriptional regulators suggesting that they could be derived from the same embryonic precursors.** Our previous work showed that AM and PIM/AM-like cells were very similar, for instance they did not

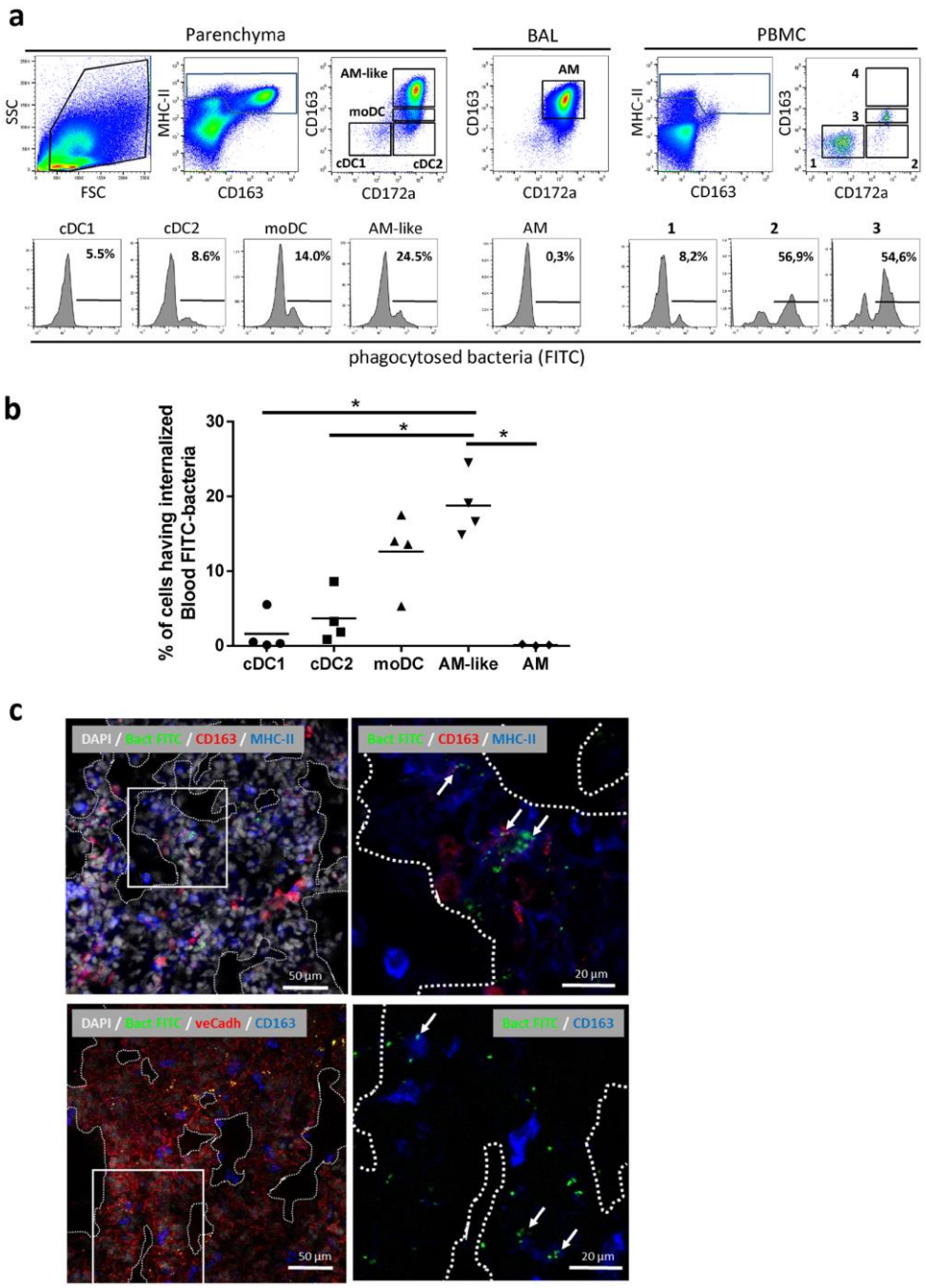



**Figure 1.** AM-like cells phagocytosed bloodborne bacteria. Inactivated FITC-labelled pseudomonas bacteria were injected in the jugular vein of anesthetized pigs. Ten minutes after, blood was collected on heparinized tubes and proceeded to Ficoll isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), animals were euthanized and cells from broncho-alveolar lavages and parenchyma were collected and stained for FACS analysis of DC and Mϕ. (**a**) Dot plot gating strategy of lung DC and Mϕ as previously described[4] and histograms of phagocytosed bacteria (FITC) signal in the different gated populations. The PBMC gate 4 contained no event. One representative out of 4 independent experiments. (**b**) Plotting of the 4 independent experiments. Statistics: Mann-Whitney test *$p < 0.05$. (**c**) Confocal imaging of parenchyma from FITC-bacteria injected animals. Upper left, DAPI (white), FITC-bacteria (green), CD163 (red) and MHC-II (blue) staining. Upper right, magnification of the squared zone of the upper left picture. Arrows indicate PIM/AM-like cells (extra-alveolar CD163pos/MHC-IIpos) having internalized FITC-bacteria. Lower left, DAPI (white), FITC-bacteria (green), ve-Cadherin (red) and CD163 (blue) staining. Lower right, magnification of the squared zone of the lower left picture. Arrows indicate PIM/AM-like cells (extra-alveolar CD163pos) localized in ve-Cadherin rich area (lung capillaries) and having internalized FITC-bacteria. Alveoli are visualized by dashed lines. Images are representative of 3 independent experiments.

express CCR2 and CX3CR1, unlike the other lung DC/Macrophages populations, whereas they both expressed high levels of MertK and CD64[4]. We then tested the differential expression of genes between macrophages derived from blood monocytes or from tissue resident embryonically-derived, self-renewable macrophages as described by Geissmann and Lambrecht teams[22,23]. Both AM and PIM/AM-like cells strongly expressed the markers differentially represented in embryonic-derived macrophages, HDAC10 and PU.1, whereas they expressed significantly lower amount of the hematopoietic cell marker c-Kit (Fig. 2a,b). This transcriptomic profile was highly distinctive from blood monocytes[24,25] and definitely excluded the possibility that PIM/AM-like cells were sequestered lung monocytes. Interestingly, MAFB, a gene involved in the decrease of macrophage proliferation during their differentiation[26], was the only observed marker differentially expressed in PIM/AM-like cells and AM. The PIM/AM-like cells express higher levels than AM (Fig. 2). Like AM, porcine PIM/AM-like cells are likely embryonic-derived macrophages, whose renewal must be independent from blood monocytes.

**PIM/AM-like cells are infected, produce PRRSV and are pro-inflammatory upon *in vitro* infection.** Because of the great similarities between AM and PIM/AM-like cells and since AM are thought to be the main target of PRRSV, we compared the susceptibility of AM and PIM/AM-like cells to PRRSV infection using the genotype 1.3 LENA virus[27]. AM and PIM/AM-like cells were cell-sorted and infected *in vitro* at low multiplicity of infection (MOI) $10^{-3}$. Then, 24 h later, intracellular viral RNA load and infectious viral particle titers were measured using RT-qPCR on the cell pellet and virus titration on cell culture supernatant. PIM/AM-like cells and AM show similar PRRSV RNA load (Fig. 3a) and PRRSV infectious particles production (Fig. 3b). However, AM presented a more variable susceptibility to *in vitro* PRRSV infection than PIM/AM-like cells. We repeated the same experiment using a high MOI in order to infect simultaneously a majority of macrophages; we measured the transcriptomic cytokine response of the cells, focusing on TFNα, IL-8 and IL-6 cytokines previously described as highly expressed in PIM[18–20]. PIM/AM-like cells significantly upregulated TNFα expression upon infection, whereas IL-8 and IL-6 were also upregulated, although non-significantly, highlighting the pro-inflammatory role of PIM/AM-like cells upon PRRSV infection (Fig. 3c).

***In vivo*, PRRSV infection of PIM/AM-like cells correlates with lung and blood PRRSV titer.** Our *in vitro* data prompted us to measure the infection of PIM/AM-like cells during *in vivo* PRRSV infection. We chose to measure AM and PIM/AM-like cells PRRSV infection at an intermediate time point of 10 days post-infection (dpi), at which LENA viremia had reach a plateau[28]. We first measured the percentage of dead cells in PIM/AM-like cells and AM populations. At day 10 post PRRSV infection, we observed a significant increase in the percentage of dead cells of these two populations (Fig. 4a) as previously described for AM[28]. Moreover, in agreement with this result, the proportion of AM and PIM/AM-like cells among MHC-II$^{high}$ BAL and parenchymal cells respectively decrease (Fig. 4b). The amount of PRRS viral RNA was then measured by RT-qPCR on sorted cells (Fig. 4c). Both AM and PIM/AM-like cells were positive for viral RNA. A correlation analysis was performed with the following parameters: AM and PIM/AM-like cells PRRSV infection titers (Fig. 4c), serum PRRSV titers (viremia, as depicted in[29]) as well as whole lung tissue viral load (Fig. 4d). PIM, but not AM infection, appeared correlated with lung titer (0.99 and 0.0025 respectively), and with serum titer (0.76 and −0.53 respectively) (Fig. 4e). This correlation must be taken with caution because it mainly stands on one individual presenting high viral titer in blood, lung and PIM/AM-like cells but not in AM.

We finally measured by RT-qPCR, the *in vivo* cytokine response of AM and PIM/AM-like cells in mock and PRRSV-infected animals at 10 dpi. No cytokine presented a significant differential expression when conditions or cell types were compared (Fig. 5a). In order to assess the global AM/PIM responses, we then ran a principal component analysis (PCA) on the cytokine data, comparing AM and PIM/AM-like cells in non-infected or infected conditions. PIM/AM-like cells produced more cytokine mRNA than AM except for IL-4 in mock infected animals, and for IFNβ, IL-12p35, IL-12p40/IL-23 and IL-4 in infected animals. In infected animals, the first axis of the PCA encompassed 39% of the total variability of the samples (Fig. 5b). It segregated IL-8 and TNFα from IFNα, IL-6, TGFβ, IL-4, IL-12p35 and IL-12p40/IL23 cytokines. Except for the inter-individual variations, no obvious interpretation for this splitting can be proposed. Interestingly the second axis still encompassed 30% of the variability and clearly segregated PIM/AM-like cells from AM. Indeed PIM/AM-like cells expressed more IL-8, TNFα, IL-6 and IFNα, whereas AM expressed more IL-12p35 and IL-4. Thus we could observe *in vivo*, a tendency of PIM to produce more cytokines than AM at steady state and upon infection. However globally, at 10dpi, both PIM/AM-like cells and AM responded weakly to PRRSV.

## Discussion

Herein, we showed that the previously described porcine AM-like cells[4] phagocytosed blood-borne bacteria and produced inflammatory cytokines such as TNFα, IL-8 and IL-6[18]. Some teams succeeded in isolating PIM using perfusion of the pulmonary vasculature with collagenase solution[30]. Using this technique, the best controlled experiment[31] measured a PIM/AM ratio of 1:10, in perfect agreement with the AM-like/AM ratio we previously observed[5]. Despite our inability to stain all AM-like cells, this last data associated with the homogeneity of AM-like cell population phenotype[4] are in strong support with the whole AM-like cell population being *bona fide* PIM.

Thanawongnuwech observed 20 years ago that collagenase-isolated PIM could be infected by PRRSV[31], moreover *in vivo* PRRSV infection decreased the ability of the lung to retain copper particles[32], in agreement with a PRRSV-mediated PIM depletion. We demonstrated here that AM-like cells were as permissive as AM to PRRSV infection *in vitro* and *in vivo*. Thus viral replication is at least as high in PIM/AM-like cells than in AM, demonstrating that AM are not the sole source of virus in the lung. Moreover, because of PIM/AM-like cells localization

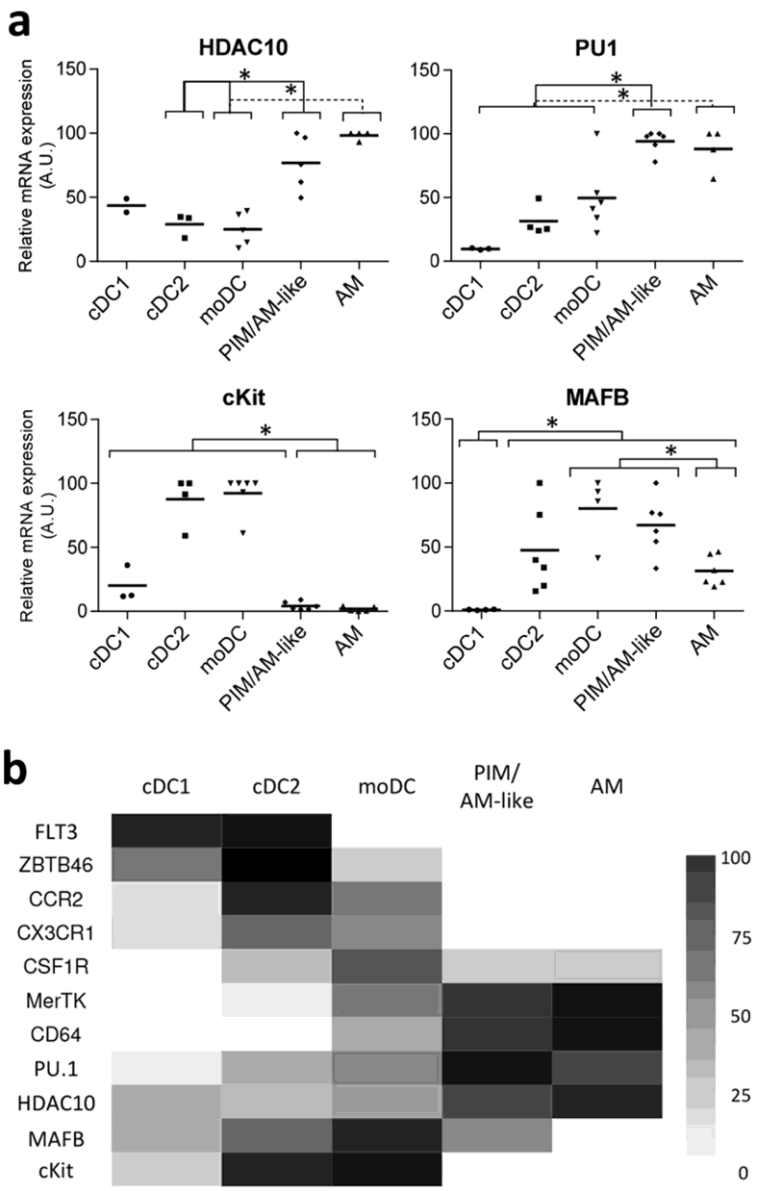



**Figure 2.** PIM/AM-like cells and AM present a gene expression profile characteristic of embryonically-derived macrophages. Conventional DC1, cDC2, moDC, PIM/AM-like cells and AM were gated as in Fig. 1 and sorted by flow cytometry. (**a**) mRNA expression levels of embryonic-monocytes derived Mϕ associated genes (HDAC10, PU1) and bone marrow precursors derived Mϕ-associated gene (cKit); as well as of MAFB, assessed by RT-qPCR. For each gene, data were normalized to the reference gene RPS24 (ribosomal protein S24) expression and presented as relative expression (arbitrary units (AUs)): for each animal, the population with the highest expression for this gene was considered as 100 and the other populations were normalized to it. Each symbol represents one animal. Statistics: Mann-Whitney test *$p < 0.05$. (**b**) Heat map synthesizing the means of real-time PCR data from A and from Maisonnasse *et al.*[4,5].

in the blood vessel lumen, allowing them to shed virus directly in the blood circulation, they might likely be the major cell types responsible for viremia.

Interestingly, we also showed here that both porcine AM and PIM/AM-like cells harbored characteristics suggesting that they derive from embryonic monocytes rather than from adult bone marrow, in consistency with what has been demonstrated for mouse AM[22,23]. Although surprising according to their location in contact with blood, PIM origin can be paralleled with the recently described resident arterial macrophages in mice[33]. These cells are embryonic monocyte-derived, and self-renew in the aortic wall[33]. It has been shown that PIM had an important role in xenogeneic graft failure, and that their depletion before pig lung graft to primate extended the duration of graft functionality[34]. The embryonic origin of PIM implies that the lung vasculature wall of the

84

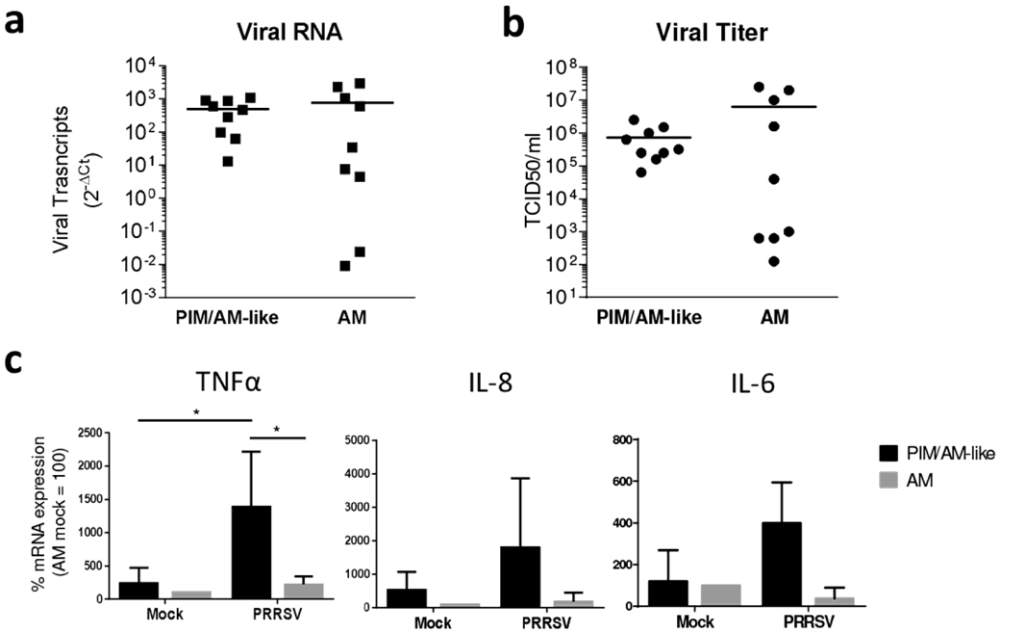



**Figure 3.** PIM/AM-like cells produce virus and upregulate inflammatory cytokines expressions upon PRRSV infection *in vitro*. (**a** and **b)** Cell-sorted PIM/AM-like cells and AM were *in vitro* infected at $10^{-3}$ MOI with LENA PRRSV strain. After 24h infection, the cell pellet and the supernatant were collected. (**a**) mRNA were extracted from cell pellets, retrotranscripted and virus RNA contents was quantified by qPCR (n = 9). (**b**) Infectious viral particles (TCID50/ml) were titrated in the supernatant according to the OIE manual (n = 9). Mock infected cells gave no signal in (**a**) as in (**b**) (data not shown). In (**c**) Cell-sorted PIM/AM-like cells and AM were *in vitro* infected at 5 MOI, cell pellet mRNA were extracted, retrotranscripted and the contents in TNFα, IL-8 and IL-6 transcripts were quantified by qPCR (n = 4, (**c**). For each animal, mock infected AM $2^{-\Delta Ct}$ mRNA cytokines expression (normalized to the reference gene RPS24) is considered as reference 100, from which PRRSV AM as well as mock and PRRSV AM-like/PIM conditions are normalized. Statistics: Mann-Whitney test *$p < 0.05$.

PIM-depleted-graft can be re-populated from progenitors present within the graft. Thus, the detrimental effect of PIM in the context of xenograft might only be postponed by PIM depletion before grafting.

PIM have been described in the species from the *Laurasiatheria* superorder whereas no PIM were observed in primates and mice, species belonging to the *Euarchontoglires* superorder[6,7,9,14]. However, in rats and humans, evidence exist of a few constitutive PIM that increase in number upon liver dysfunctions[35–37]. In the rat model, PIM induced upon bile-duct ligation were shown to be responsible for endotoxin-induced mortality[38]. It would thus be interesting to re-examine the role of PIM in the liver-induced inflammatory medical conditions.

Interestingly, it has been shown in lambs that PIM and AM appeared in the developing lung within the same time frame, increasing progressively from 1 day to 3 weeks of age[39]. It is tempting to speculate that AM and PIM originate from the same lung cell precursor that relocate after birth either in the alveoli or the lung endothelium. This precursor would have, even in *Euarchontoglires*, the potential to differentiate in PIM, provided the appropriate, still unknown, endothelial/blood stimulus is present.

It is worth noting that AM express lower MAFB mRNA than PIM/AM-like cells. MAFB has been described as a repressor of cell-renewal capacities in adult macrophages[40]. Thus the higher MAFB expression in PIM/AM-like cells would be in agreement with a lower proliferation capacity compare to AM, raising the interesting possibility that PIM/AM-like cells would originate from AM.

## Materials and Methods

**Pseudomonas FITC-staining.** $1.10^{10}$ cfu of UV-inactivated *pseudomonas* were resuspended at 2 mg/ml in 0.1 M $Na_2CO_3$ pH9 buffer and 150 µg of fluorescein isothiocyanate (FITC) (SIGMA) per ml of bacteria were added and incubated for 2h at 4 °C. Bacteria (FITC-*pseudomonas*) were then washed twice in PBS and frozen in glycerol before use.

**Pig lung cells collection.** For *in vitro* characterization and infection, lung tissue samples were obtained from 5- to 7-month-old Large White conventionally bred sows from UEPAO, Tours, France. A BAL procedure was performed twice on the isolated left lung with 250 ml of PBS supplemented with 2mM EDTA (PBS/EDTA), to collect AM. Next, a 1-cm slice of external lung parenchyma was dissected from the same lung. Tissues were minced and incubated in nonculture-treated Petri dishes, to avoid differential plastic adherence of MΦ and DC, for 2 h at 37 °C in complete RPMI, consisting of RPMI 1640 supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml

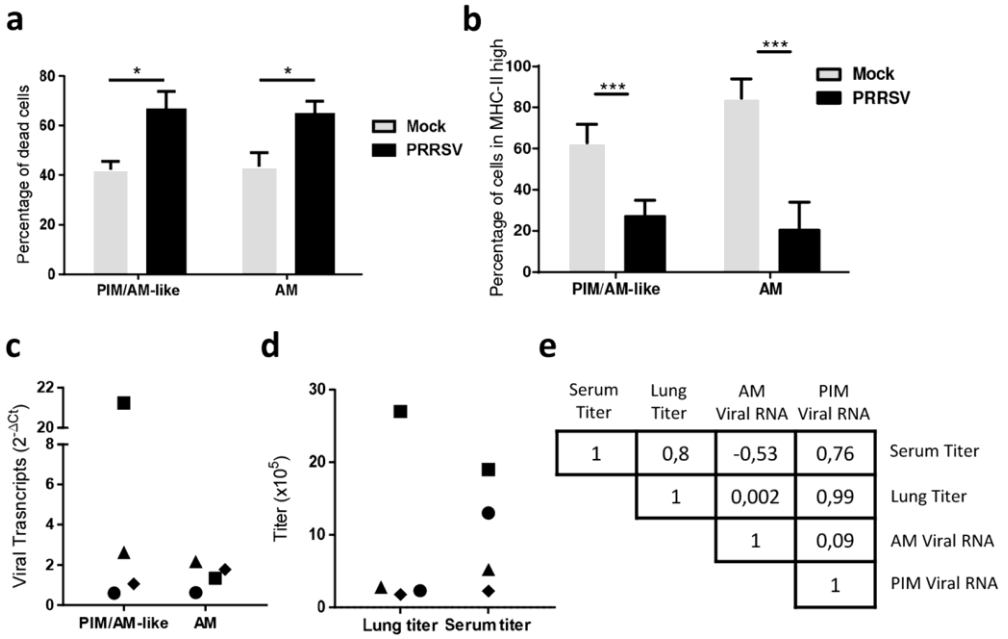



**Figure 4.** PIM/AM-like cells are depleted upon *in vivo* PRRSV infection and their infection is correlated with viremia and lung titer. *In vivo* infected pigs were euthanized 10 days post-infection, their lung sampled and BAL and parenchymal cells collected, stained, analysed and sorted as above. (**a**) Percentage of dead cells (DAPI-positive) among PIM/AM-like cells and AM, in control (Grey bars, 4 animals) and infected (Black bars, 4 animals) lung after immunostaining. Statistics: Mann-Whitneytest *$p < 0.05$. (**b**) Percentage of AM and PIM/AM-like cells were monitored in control (Grey bars, 4 animals) and infected (Black bars, 4 animals) lung after immunostaining. Data are expressed as a percentage of MHC-IIhigh cells. Statistics: Mann-Whitney test ***$p < 0.001$. (**c**) Detection of viral transcripts on sorted AM and PIM/AM-like cells was assessed by RT-qPCR. Data were normalized to the reference gene RPS24 expression. Statistics: Mann-Whitney *$p < 0.05$. (**d**) Right, lung and serum titers from data previously presented in Renson *et al.*[29] (**e**) Pearson correlation coefficient determinations of the different parameters obtained from the *in vivo* infection (**c** and **d** data).

streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 10% inactivated foetal calf serum (FCS) (all from Invitrogen, Paisley, UK), containing 2 mg/ml collagenase D (Roche, Meylan, France), 1 mg/ml dispase (Invitrogen), and 0.1 mg/ml Dnase I (Roche). Cells were passed through 40 µm cell strainers and red blood cells lysed with erythrocytes lysis buffer (10 mM $NaHCO_3$, 155 mM NH4Cl, and 10 mM EDTA). Next, cells were washed with PBS/EDTA, counted, and step-frozen in FCS/10% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) before staining and flow cytometry analysis or cell sorting.

For *in vivo* PIM targeting, experiments were performed at INRA GABI (Jouy en Josas, France). The animal experiment protocol was approved by the French Ethics Committee for Animal Experiments (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale du Centre INRA de Jouy-en-Josas et AgroParisTech) and authorized by the French Ministry for Research (authorization no. 2017051200952846). All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. The right jugular vein of 30 to 40 weeks old Melanoma Libechov Minipigs[41] conventionally bred from GABI (INRA, Jouy en Josas, France) were catheterized under gaseous anaesthesia in order to reach the right atrium. Before FITC-*pseudomonas* injection, 30 ml of blood was withdrawn in heparinized tube as negative control. 0.6 to 10 mg of FITC-*pseudomonas* were resuspended in 5 ml physiological serum and injected in the catheter. After 10 minutes, 30 ml of blood was withdraw in heparinized tube as positive control. The animal was euthanized and the lung was sampled. An extensive BAL was processed using 3 times 100 ml PBS/EDTA. Parenchyma was collected, a 1 cm piece was frozen in Tissue Teck (Sakura, Paris, France) and conserved at −80 °C, and the remaining tissue was minced and digested in Collagenase/Dispase/DNase medium, and single cell suspension was retrieved as previously described[4]. BAL and parenchymal cell suspensions were then frozen in FCS/10% DMSO. Blood cells were ficolled and PBMC were then frozen in FCS/10% DMSO.

**Flow cytometry analysis and cell sorting.** Pig cell surface staining was performed as previously described[4], using anti-MHC-II (clone MSA3) and anti-CD172a (clone 74-22-15a) (monoclonal antibody center Washington State University - Pullmann, WA), unlabelled or Phycoerythrin (PE) coupled anti-CD163 (clone 2A10/11) from Serotec (Oxford, UK) and isotype matched secondary antibodies coupled to PE, Alexa-488, and Alexa-647 (Invitrogen). Infected cells were then fixed in 4% paraformaldehyde before flow cytometry analysis. Samples were acquired on a Fortessa (BD-Bioscience) or sorted on a MoFlo ASTRIOS (Beckman-Coulter). For sorting, preparations were enriched in DC/Macrophages by gradient (Optiprep; Nycomed Pharma). Acquired data were analysed using FlowJo software (version X.0.6).

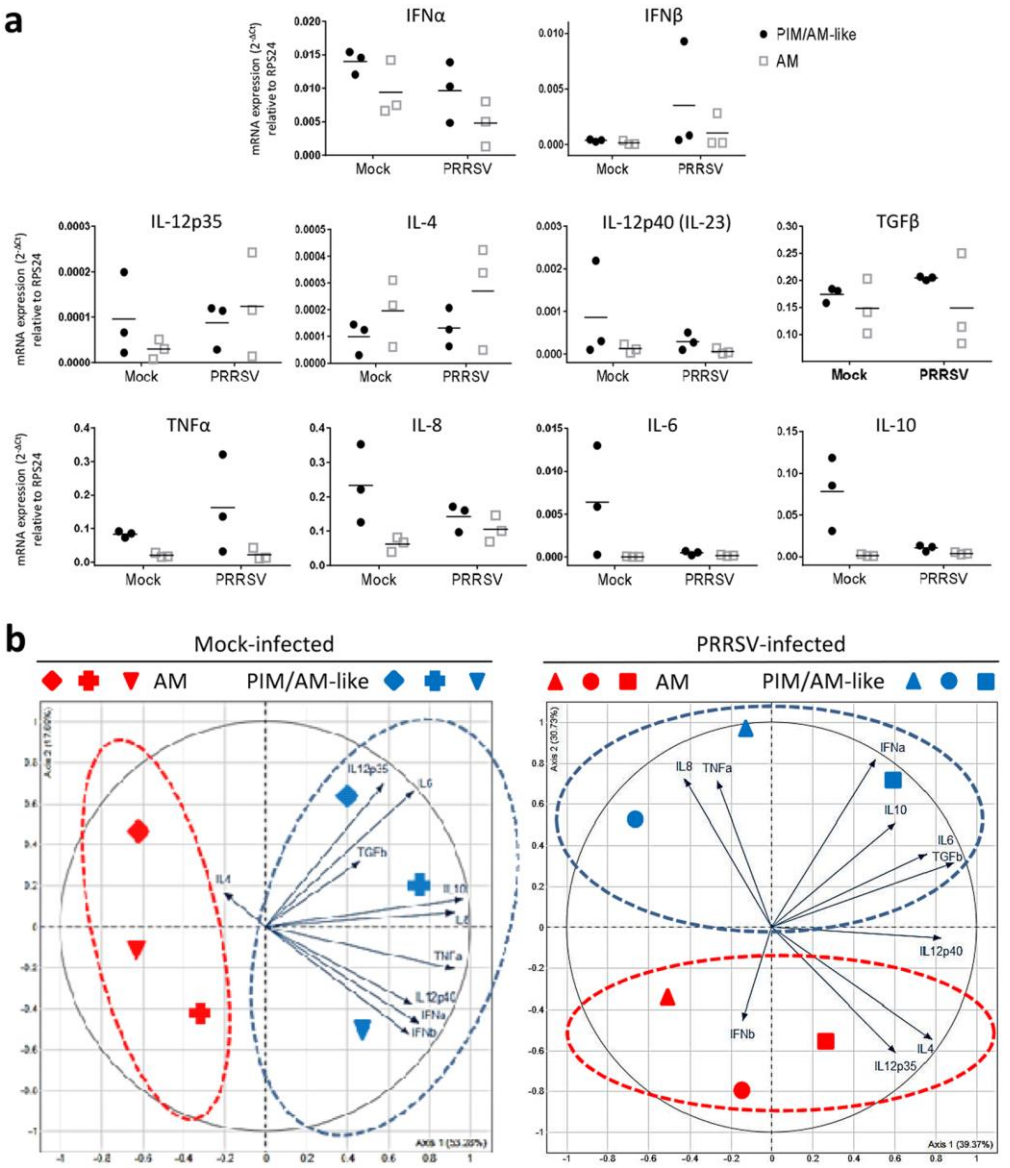



**Figure 5.** PIM/AM-like cells produce more cytokines than AM at steady state and upon PRRSV infection *in vivo*. *In vivo* infected pigs were euthanized 10 days post-infection, their lung collected and BAL and parenchymal cells extracted, stained, analysed and sorted as above. **(a)** Transcriptomic expression (RT-qPCR) of different cytokines of the innate and adaptive immune response. For each animal, mock infected AM $2^{-\Delta Ct}$ mRNA cytokines expression (normalized to the reference gene RPS24) is considered as reference 100, from which PRRSV AM as well as mock and PRRSV AM-like/PIM conditions are normalized. **(b)** Principal Component Analysis of the cytokines transcriptomic expressions raw data ($2^{-\Delta Ct}$) for AM and PIM/AM-like cells of the 3 mock infected (left) and 3 PRRSV infected (right) animals depicted in (**a**). Each symbol represents the projection on the PCA analysis of one of the 6 different animals cell types (AM in red and PIM/AM-like cells in blue).

**Microscopy.** Sections of 14 µm were obtained from the parenchyma frozen in Tissue Teck using a cryostat (Leica CM3050S, Nanterre, France) and deposed on Superfrost® glass slides (ThermoFisher scientific). Cryosections were fixed in methanol/acetone (1:1) at −20 °C for 20 min. Fixed slides were saturated using PBS supplemented with 5% horse serum (HS) and 5% swine serum (SS) 30 min at room temperature (RT). The same primary antibodies anti-MHC-II, anti-CD163 as in flow cytometry were used as well as anti-FITC (Fluorescein/Oregon Green Polyclonal Antibody, Alexa Fluor 488, ThermoFisher scientific) and a poly-clonal rabbit anti-ve-Cadherin (H-72, Santa-Cruz Biotechnology, UK), and secondary antibodies were added at 4 °C overnight or 30 min, respectively. Slides were analyzed using an LSM510/U700 confocal microscope (Zeiss, LePecq, France).

**Cell infection and viral titration.** Sorted populations were cultured in complete RPMI for 24 h in flat-bottom 96-well plates with $3.10^5$ cells/well and then infected at a MOI of $10^{-3}$ with a PRRSV virus (LENA) in complete RPMI. At 24hpi, supernatants were collected and frozen at −80 °C. After washing, cells were lysed in 100µL of RNA extraction buffer from the Arcturus PicoPure RNA Isolation kit (Life Technologies) for quantification of viral RNA by RT-qPCR. The same protocol was applied with a MOI of 5 for quantification of cytokine production by RT-qPCR. PRRSV titers (TCID50/ml) were assessed according to the OIE manual of diagnostic test.

**RNA extraction.** Total RNA from sorted cells or infected cells were extracted using the Arcturus PicoPure RNA Isolation kit according to the manufacturer's instructions. Contaminating genomic DNA was removed using a Qiagen RNase free DNase set.

**Real-time quantitative PCR (qPCR).** RNA was reverse transcribed using random hexamers and the Multiscribe reverse transcriptase (Life Technologies). qPCR were performed as previously described[4]. The primers used were: HDAC10 (F: CCGCCGCCAATGGAT, R: GGGCATGCTTGGCTGCTA), PU1 (F: TCCCCCCTCAGCCATCA, R: GCGTTTGGCGTTGGTAGAGA), cKit (F: TGGGCTCGAGAAGTCAAGTATTT, R: ATGCCCGGAGAGCATTTTT), MAFB (F: TGCGTTCTTTAGACCAATATGTTATGT, R: CACCAAT AACTCGCCCGCTAT), PRRSV (F: ATGGCCAGCCAGTCAATCAG, R: GGAACGTTCAGTTCCGGTGA); TNFα (F: TGGTGGTGCCGACAGATG, R: CAGCCTTGGCCCCTGAA); IL-6 (F: CTGCTTCTGGTGATGG CTACTG; R: GGCATCACCTTTGGCATCTT). IL-8. 8 (F: TCCTGCTTTCTGCAGCTCTCT, R: GCACT GGCATCGAAGTTCTG); IFNα (F: TCTGCAAGGTTCCCAATGG, R: GGCATTGCAGCTGAGTAGCA); IFNβ (F: CAGCAATTTGGCATGTCAGAA, R: TTCATCCTATCTTCGAGGCAATATT); IL-12p35 (F: CGTGCCTCGGGCAATTATAA, R: CAGGTGAGGTCGCTAGTTTGG); IL-4 (F: GCCGGGCCTCGACTGT, R: TCCGCTCAGGAGGCTCTTC); IL-12p40/IL-23 (F: GGAGCACCCCACATTCCTACT, R: TTCTCTT TTGTTCTTGCCCTGAA); TGFβ (F: GAAGCGCATCGAGGCCATTC, R: GGCTCCGGTTCGACACTTTC); IL-10 (F: GAGCCAACTGCAGCTTCCA, R: TCAGGACAAATAGCCCACTAGCTT). For each gene, data were normalized to the reference gene RPS24 (Ribosomal Protein S24) expression and presented as relative expression (arbitrary units (AU)). In Fig. 2, for each animal, the population with the highest expression was considered as 100 and the other populations were normalized to it. Each symbol represents one animal.

***In vivo* infection and tissue collection.** For *in vivo* PRRSV infections, experiments were performed at ANSES (Ploufragan, France). The animal experiment was authorized by the French Ministry for Research (authorization no. 2015060113297443) and approved by the national ethics committee (authorization no. 07/07/15). Eight specific pathogen-free (SPF) pigs (free from PRRSV, *Actinobacillus pleuropneumoniae, Mycoplasma hyopneumoniae)* were housed in biosecurity level-3 air-filtered animal facilities. Treatments, housing, and husbandry conditions conformed to the European Union Guidelines (Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes). At 10 weeks of age, 4 pigs were inoculated intranasally with LENA strain ($5.10^5$ TCID50/per animal in 2.5 ml per nostril). Ten days post infection, animals were anesthetized (Zoletil, Virbac, France) and exsanguinated. BAL cells were collected using 500 ml PBS/EDTA for right and left diaphragmatic lobes. BAL and parenchymal cells were sampled as above (pig lung cells collection). Cells were washed in PBS/EDTA and frozen in FBS/10% DMSO. A part of the data issued from this *in vivo* infection has already been published in[28].

**Statistical analysis.** All data were analysed using Graph Pad Prism (version 6) for Mann-Whitney test; R software (version 3.4.0) and package FactoMineR (version 1.39) for *Principal Component Analysis* method (PCA) and Pearson correlation coefficient determinations. When scatter plots are used, the mean is depicted by a horizontal bar.

**Data availability.** The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## References


1. Chae, C. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and Mycoplasma hyopneumoniae. *Vet J* **212**, 1–6, https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.030 (2016).
2. Butler, J. E. *et al*. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. *Immunol Res* **59**, 81–108, https://doi.org/10.1007/s12026-014-8549-5 (2014).
3. Meurens, F., Summerfield, A., Nauwynck, H., Saif, L. & Gerdts, V. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol* **20**, 50–57, https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.002 (2012).
4. Maisonnasse, P. *et al*. The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. *Mucosal Immunol* **9**, 835–849, https://doi.org/10.1038/mi.2015.105 (2016).
5. Maisonnasse, P., Bordet, E., Bouguyon, E. & Bertho, N. Broncho Alveolar Dendritic Cells and Macrophages Are Highly Similar to Their Interstitial Counterparts. *PLoS One* **11**, e0167315, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167315 (2016).
6. Patel, B. V., Tatham, K. C., Wilson, M. R., O'Dea, K. P. & Takata, M. *In vivo* compartmental analysis of leukocytes in mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **309**, L639–652, https://doi.org/10.1152/ajplung.00140.2015 (2015).
7. Cai, Y. *et al*. *In vivo* characterization of alveolar and interstitial lung macrophages in rhesus macaques: implications for understanding lung disease in humans. *J Immunol* **192**, 2821–2829, https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302269 (2014).
8. Longworth, K. E. The comparative biology of pulmonary intravascular macrophages. *Front Biosci* **2**, d232–241 (1997).
9. Brain, J. D., Molina, R. M., DeCamp, M. M. & Warner, A. E. Pulmonary intravascular macrophages: their contribution to the mononuclear phagocyte system in 13 species. *Am J Physiol* **276**, L146–154 (1999).
10. Atwal, O. S. & Saldanha, K. A. Erythrophagocytosis in alveolar capillaries of goat lung: ultrastructural properties of blood monocytes. *Acta Anat (Basel)* 124, (245–254 (1985).
11. Warner, A. E., Barry, B. E. & Brain, J. D. Pulmonary intravascular macrophages in sheep. *Morphology and function of a novel constituent of the mononuclear phagocyte system. Lab Invest* **55**, 276–288 (1986).

12. Warner, A. E. & Brain, J. D. Intravascular pulmonary macrophages: a novel cell removes particles from blood. *Am J Physiol* **250**, R728–732 (1986).
13. Carrasco, L. *et al.* Pulmonary intravascular macrophages in deer. *Vet Res* **27**, 71–77 (1996).
14. Kawashima, M., Kuwamura, M., Takeya, M. & Yamate, J. Morphologic characteristics of pulmonary macrophages in cetaceans: particular reference to pulmonary intravascular macrophages as a newly identified type. *Vet Pathol* **41**, 682–686, https://doi.org/10.1354/vp.41-6-682 (2004).
15. Staub, N. C. Pulmonary intravascular macrophages. *Annu Rev Physiol* **56**, 47–67, https://doi.org/10.1146/annurev.ph.56.030194.000403 (1994).
16. Carrasco, L. *et al.* African swine fever: Expression of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha by pulmonary intravascular macrophages. *J Comp Pathol* **126**, 194–201, https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0543 (2002).
17. Parbhakar, O. P., Duke, T., Townsend, H. G. & Singh, B. Depletion of pulmonary intravascular macrophages partially inhibits lipopolysaccharide-induced lung inflammation in horses. *Vet Res* **36**, 557–569, https://doi.org/10.1051/vetres:2005016 (2005).
18. Singh, B., Pearce, J. W., Gamage, L. N., Janardhan, K. & Caldwell, S. Depletion of pulmonary intravascular macrophages inhibits acute lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L363–372, https://doi.org/10.1152/ajplung.00003.2003 (2004).
19. Chen, Z. T. *et al.* LPS induces pulmonary intravascular macrophages producing inflammatory mediators via activating NF-kappaB. *J Cell Biochem* **89**, 1206–1214, https://doi.org/10.1002/jcb.10590 (2003).
20. Chitko-McKown, C. G. *et al.* Porcine alveolar and pulmonary intravascular macrophages: comparison of immune functions. *J Leukoc Biol* **50**, 364–372 (1991).
21. Gory, S. *et al.* The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood* **93**, 184–192 (1999).
22. Schulz, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**, 86–90, https://doi.org/10.1126/science.1219179 (2012).
23. Guilliams, M. *et al.* Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* **210**, 1977–1992, https://doi.org/10.1084/jem.20131199 (2013).
24. Auray, G. *et al.* Characterization and Transcriptomic Analysis of Porcine Blood Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells Reveals Striking Species-Specific Differences. *J Immunol* **197**, 4791–4806, https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600672 (2016).
25. Moreno, S. *et al.* Porcine monocyte subsets differ in the expression of CCR2 and in their responsiveness to CCL2. *Vet Res* **41**, 76, https://doi.org/10.1051/vetres/2010048 (2010).
26. Aziz, A., Soucie, E., Sarrazin, S. & Sieweke, M. H. MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science* **326**, 867–871, https://doi.org/10.1126/science.1176056 (2009).
27. Karniychuk, U. U. *et al.* Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet Res* **6**, 30, https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-30 (2010).
28. Renson, P. *et al.* Dynamic changes in bronchoalveolar macrophages and cytokines during infection of pigs with a highly or low pathogenic genotype 1 PRRSV strain. *Vet Res* **48**, 15, https://doi.org/10.1186/s13567-017-0420-y (2017).
29. Renson, P. *et al.* Preparation for emergence of an Eastern European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strain in Western Europe: Immunization with modified live virus vaccines or a field strain confers partial protection. *Vet Microbiol* **204**, 133–140, https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.021 (2017).
30. Morton, D. & Bertram, T. A. Isolation and preliminary *in vitro* characterization of the porcine pulmonary intravascular macrophage. *J Leukoc Biol* **43**, 403–410 (1988).
31. Thanawongnuwech, R., Thacker, E. L. & Halbur, P. G. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): *in vitro* comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). *Vet Immunol Immunopathol* **59**, 323–335 (1997).
32. Thanawongnuwech, R., Halbur, P. G., Ackermann, M. R., Thacker, E. L. & Royer, R. L. Effects of low (modified-live virus vaccine) and high (VR-2385)-virulence strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pulmonary clearance of copper particles in pigs. *Vet Pathol* **35**, 398–406, https://doi.org/10.1177/030098589803500509 (1998).
33. Ensan, S. *et al.* Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nat Immunol* **17**, 159–168, https://doi.org/10.1038/ni.3343 (2016).
34. Cantu, E. *et al.* Depletion of pulmonary intravascular macrophages prevents hyperacute pulmonary xenograft dysfunction. *Transplantation* **81**, 1157–1164, https://doi.org/10.1097/01.tp.0000169758.57679.2a (2006).
35. Shih, W. J., Domstad, P. A., Friedman, B. & DeLand, F. H. Intrathoracic abnormalities demonstrated by technetium-99m sulfur colloid imaging. *Clin Nucl Med* **11**, 792–796 (1986).
36. Dehring, D. J. & Wismar, B. L. Intravascular macrophages in pulmonary capillaries of humans. *Am Rev Respir Dis* **139**, 1027–1029, https://doi.org/10.1164/ajrccm/139.4.1027 (1989).
37. Klingensmith, W. C. 3rd, Yang, S. L. & Wagner, H. N. Jr. Lung uptake of Tc-99m sulfur colloid in liver and spleen imaging. *J Nucl Med* **19**, 31–35 (1978).
38. Gill, S. S. *et al.* Role of pulmonary intravascular macrophages in endotoxin-induced lung inflammation and mortality in a rat model. *Respir Res* **9**, 69, https://doi.org/10.1186/1465-9921-9-69 (2008).
39. Longworth, K. E., Westgate, A. M., Grady, M. K., Westcott, J. Y. & Staub, N. C. Development of pulmonary intravascular macrophage function in newborn lambs. *J Appl Physiol (1985)* **73**, 2608–2615 (1992).
40. Soucie, E. L. *et al.* Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. *Science* **351**, aad5510, https://doi.org/10.1126/science.aad5510 (2016).
41. Horak, V., Fortyn, K., Hruban, V. & Klaudy, J. Hereditary melanoblastoma in miniature pigs and its successful therapy by devitalization technique. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45**, 1119–1129 (1999).


## Acknowledgements

This work was funded by the Animal Health and Welfare ERA-Net (anihwa) - project KILLeuPRRSV; the H2020 SAPHIR program. This work was also supported by the Regional Council of Brittany (Grant number 15008342), Union des Groupements de Producteurs de Viande de Bretagne –UGPVB – (Grant number P243B) and Boehringer Ingelheim Animal Health (Grant number 12241 sc). EB1 and CB were supported by H2020 SAPHIR. PM was supported by the Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire and the Fondation du Souffle. EC was supported by the Animal Health and Welfare ERA-Net (anihwa) - project KILLeuPRRSV and the AgreenSkills+ fellowship programme which has received funding from the EU's Seventh Framework Programme under grant agreement No FP7-609398. We thank Elisabetta Giuffra (GABI, INRA Jouy en Josas) for the ERA-Net KilleuPRRSV project WP2 coordination. We would like to thank Christophe Staub and the UEPAO staff for their help in samples collection. We thank Mickael Bourge from I2BC (CNRS, Gif-sur-Yvette, France), for the help in cell sorting. We thank Hans Nauwynck for the kind gift of PRRSV LENA virus. We thank the MIMA2 platform for access to confocal microscopy. We thank Fred Fuller (North Carolina State University College of Veterinary Medicine, Raleigh, USA) for his valuable suggestions during the preparation of the manuscript.

## Author Contributions

E.B.1., P.M., E.B.2., E.C., P.R. and C.B.C. performed the experiments, C.U. performed the confocal imaging, F.L. brought the skills for PRRS virus manipulations, D.D. brought the skills for *pseudomonas* manipulation, L.J, M.T. and E.B.1. performed the statistical analysis, I.S.C. provided financial support, thorough discussions and critical manuscript reading, J.J.L. and O.B. supervised the *in vivo* experiments, N.B. provided financial support, supervised the working program, performed experiments and wrote the manuscript.

## Additional Information

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2018

### *Discussion complémentaire*

Dans cette étude, la localisation intravasculaire des PIM/AM-like et leur forte capacité d'infection par le SDRPv appuient l'hypothèse qu'elles pourraient être impliquées dans la mise en place de la virémie. Dans nos travaux, une corrélation existe entre virémie et niveau d'infection des PIM/AM-like. Néanmoins, les contraintes techniques et économiques n'ont pas permis d'accéder à un nombre important d'individus, affaiblissant les conclusions statistiques. Il serait intéressant de réétudier cette corrélation avec un nombre plus important d'individus. De surcroît, une variabilité dans l'expression de CD163 chez les AM-like a été observée et cette expression semblait corrélée au niveau d'infection des AM-like. Il serait donc passionnant de comparer virémie, niveau d'expression de CD163 et niveau d'infection de AM-like. Une expérience idéale serait de rendre possible une déplétion des PIM/AM-like *in vivo* avant l'infection par le SDRPv et de comparer la cinétique de virémie chez les animaux déficients en PIM/AM-like. La déplétion des PIM peut être réalisée par injection de liposomes de chlodronate et/ou de chlorure de gadolinium (revue (Schneberger et al., 2012)).

Afin de détecter la réplication virale, nous utilisons des approches de RT-qPCR et de titration du surnageant de culture des AM-like. Avant de choisir ces approches, d'autres stratégies ont été envisagées et testées sans conférer de meilleurs résultats. Pour l'approche de RT-qPCR, les amorces que nous utilisons sont dirigées sur le brin d'ARN positif du SDRPv qui correspond au génome viral. Ces amorces ne permettent pas de distinguer les ARN constitutifs des particules virales des ARN produits lors de la réplication dans les cellules. Nous avons testé des techniques visant à détecter uniquement les brins d'ARN produits lors de la réplication. En effet, la complexité de la réplication virale du SDRPv permet d'envisager la détection des brins d'ARN subgénomiques négatifs produits lors de la réplication. La détection de ces brins permettrait des conclusions plus solides que celles basées sur la détection du génome viral. En effet, les macrophages étant des cellules phagocytaires, il est possible qu'une partie de l'ARN détecté provienne de la phagocytose ou de l'ARN génomique contenu dans des virions fixés à la membrane cellulaire. Malheureusement, ces stratégies de détection se sont avérées soit infructueuses soit peu fiables.

Quant à l'origine des macrophages étudiés, l'analyse des gènes HDAC10 et PU.1 peut participer à l'hypothèse d'une origine embryonnaire de ces cellules. Chez la souris, les AM ont une origine embryonnaire et se renouvellent après la naissance de manière indépendante des monocytes du sang (Yona et al., 2013; Guilliams et al., 2013). Dans le modèle murin, de

nombreuses approches existent pour étudier l'origine des cellules. Ainsi, on peut citer les expériences de déplétion et de transfert à l'aide de souris congéniques CD45.1+ et CD45.2+ qui permettent d'identifier si les cellules qui colonisent le tissu après la déplétion sont originaires de la souris « donneuse » ou « receveuse ». Néanmoins, il faut garder à l'esprit que toute expérience de déplétion ne mime pas les conditions naturelles où il est rare qu'une grande partie des macrophages d'un tissu soit éliminée. Récemment, de nouvelles approches ont émergé telles que l'utilisation de souris parabiotiques qui partagent la même circulation sanguine. Les avancées technologiques permettent de suivre les cellules originaires d'une cellule précurseur *via* des approches combinées de recombinases inductibles, de constructions fluorescentes et de microscopie intravitale (revue (Kretzschmar & Watt, 2012)). Chez le porc, de telles approches sont extrêmement difficiles à mettre en place. L'une des approches envisageables serait la comparaison des profils transcriptomiques et protéomiques des AM et des AM-like avec d'autres espèces. Une telle approche a été réalisé chez le mouton et le porc, sur des macrophages, des monocytes et des DC, et a permis d'identifier des gènes conservés entre espèces au sein des sous-populations cellulaires (Vu Manh et al., 2015)

Une étude transcriptomique en cours et menée par Nicolas Bertho, Elisa Crisci et Elisabetha Giuffra, avec la participation de Marco Moroldo et de moi-même a permis de comparer les AM et les AM-like par une approche de *RNA-Seq*. Cette étude a mis en évidence 1038 gènes différentiellement exprimés (DE) entre AM et PIM/AM-like alors qu'il existe 2392 gènes DE entre cDC1 et cDC2, et 6494 gènes DE entre cDC1 et AM. Une analyse *Ingenuity Canonical Pathways* a révélé que 92 voies de signalisation étaient différentiellement exprimées entre AM et PIM/AM-like. Parmi les gènes différentiellement exprimés, la plupart sont impliqués dans le contact entre les cellules, les jonctions serrées et des protéines de la matrice extracellulaire. Notamment, le gène *SCARA-5* (aussi nommé macrophage scavenger receptor 1 : MSR1 ou CD204) correspond à un récepteur présent sur la membrane des macrophages et est impliqué dans l'adhésion de *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). De manière intéressante, il existe un anticorps dirigé contre le récepteur humain SCARA-5, ce qui permettrait d'avoir accès à un marqueur pour différencier AM et AM-like dans nos analyses de cytométrie en flux et d'explorer l'implication éventuelle des PIM dans certaines pathologies inflammatoires humaines.

Au vu de nos résultats, les AM et AM-like ont un phénotype très proche malgré un environnement très différent. En effet, les AM sont au contact du surfactant alors que les AM-

like sont au contact du sang. On peut s'interroger sur une telle ressemblance malgré des environnements aussi différents. En effet, même si les macrophages d'origine embryonnaire dérivent des mêmes précurseurs, ces cellules auront des fonctions très différentes dans les tissus. Il a été montré que l'environnement tissulaire dirige l'acquisition des fonctionnalités des macrophages spécifiques d'un organe et ceux-ci par l'intermédiaire de facteurs de transcription spécifiques de cet organe. Ainsi l'environnement, par l'intermédiaire des molécules comme PPAR-γ, l'acide rétinoïque ou TGF-β active différentiellement des programmes d'expression de gènes lorsque les précurseurs de macrophage colonisent un tissu. Ces programmes d'expression vont aboutir à l'expression de facteurs de transcription spécifiques du tissu qui eux-mêmes vont réguler en collaboration avec PU.1, la mise en place du profil d'expression spécifique du tissu dans le macrophage. Ces mécanismes expliquent comment des macrophages avec des fonctionnalités si différentes peuvent émerger de précurseurs identiques (Gautier et al., 2012; Lavin et al., 2014; Gosselin et al., 2014)).

## Papier n°3 : La souche Lena type 1.3 induit une activation des cDC1 et une polarisation vers une réponse Th1 sans infecter ces cellules

### *Introduction des travaux*

Alors qu'un consensus existe sur l'infection *in vitro* des DC par le type 2, aucune démonstration *in vivo* n'a été faite pour le type 1. De plus, une variabilité dans les capacités d'infection semble exister au sein des souches européennes. Frydas *et al.* ont démontré que les souches Lena et Lelystad (LV) infectaient un panel de cellules différent dans les muqueuses nasales (Frydas et al., 2015). Salguero *et al.* ont quant à eux suggéré que la virulence serait reliée à la capacité d'interaction entre les DC et les souches européennes. Dans cette hypothèse, ils supposent que la faible réponse immunitaire induite par les souches de type 1 peu virulentes ne serait pas due à un caractère immunosuppresseur du virus mais à un défaut de reconnaissance du virus par les DC (Salguero et al., 2015).

Dans ce papier, nous utilisons 3 souches européennes de type 1 : les souches de type 1.1 Lelystad (LV) et Flanders13 (FL13) et la souche de type 1.3 Lena. L'utilisation de ces 3 souches ayant des degrés de virulence différents sera un atout pour étudier le lien potentiel entre la virulence et la capacité du SDRPv à infecter les DC. Notre but est d'identifier si les infections de type 1.1 et 1.3 impactent différentiellement la fonctionnalité des DC, la polarisation de la réponse T *helper* et l'induction d'une réponse cellulaire.

Pour résumer cette publication, l'étude de l'infection des DC par les 3 souches européennes *in vitro* et *in vivo* n'a révélé aucune infection substantielle des cDC1, cDC2 et moDC. Lorsque les DC sont cultivées avec les 3 souches puis mises en contact avec des lymphocytes allogéniques, expérience nommée *Mixed Lymphocytes Reaction assay* (MLR), la souche Lena se distingue des souches de type 1.1. En effet, cette souche induit une polarisation de type Th1 alors qu'un tel résultat n'est pas observé avec les autres souches. Afin de collecter des indices *in vivo*, sur la possibilité d'une telle polarisation par la souche Lena, le profil cytokinique de DC provenant de porcs infectés par Lena ont été comparés à ceux de porcs non infectés. Le but de cette analyse est d'essayer d'appréhender si cette infection impacterait les fonctionnalités des DC *in vivo*.

Cet article est accepté dans *Frontiers in Immunology*.

# Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Lena Type 1.3 Triggers Conventional Dendritic Cells 1 Activation and Type 1 Immune Response without Infecting Dendritic Cells

Elise Bordet[1], Fany Blanc[2], Mathieu Tiret[2], Elisa Crisci[2,3], Edwige Bouguyon[1], Patricia Renson[4,5,6], Pauline Maisonnasse[1], Mickael Bourge[7], Jean-Jacques Leplat[2], Elisabetta Giuffra[2], Luc Jouneau[1], Isabelle Schwartz-Cornil[1], Olivier Bourry[4,5] and Nicolas Bertho[1*]

[1]Virologie et Immunologie Moléculaire, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France.

[2]UMR Génétique Animale et Biologie Intégrative, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France.

[3]College of Veterinary Medicine, Department of Population Health and Pathobiology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA

[4]Virologie et Immunologie Porcines, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Ploufragan, France.

[5]Université Bretagne Loire, Rennes, France.

[6]Union des Groupements de Producteurs de Viande de Bretagne (UGPVB), Rennes, France

[7]Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France.

*Abstract*

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is an arterivirus responsible for highly contagious infection and huge economic losses in pig industry. Two species, PRRSV-1 and PRRSV-2 are distinguished, PRRSV-1 being more prevalent in Europe. PRRSV-1 can further be divided in subtypes. PRRSV-1.3 such as Lena are more pathogenic than PRRSV-1.1 such as Lelystad or Flanders13. PRRSV-1.3 viruses trigger a higher Th1 response than PRRSV-1.1, although the role of the cellular immune response in PRRSV clearance remains ill defined. The pathogenicity as well as the T cell response inductions may be differentially impacted according to the capacity of the virus strain to infect and/or activate DCs. However, the interactions of PRRSV with *in vivo*-differentiated-DC subtypes such as conventional DC1 (cDC1), cDC2 and monocyte-derived DCs (moDC) have not been thoroughly investigated. Here, DC subpopulations from Lena *in vivo* infected pigs were analyzed for viral genome detection. This experiment demonstrates that cDC1, cDC2 and moDC are not infected *in vivo* by Lena. Analysis of DC cytokines production revealed that cDC1 are clearly activated *in vivo* by Lena. *In vitro* comparison of 3 Europeans strains revealed no infection of the cDC1 and cDC2 and no or little infection of moDC with Lena, whereas the two PRRSV-1.1 strains infect none of the 3 DC subtypes. In vitro investigation of T helper polarization and cytokines production demonstrate that Lena induces a higher Th1 polarization and IFNγ secretion than FL13 and LV. Altogether, this work suggests an activation of cDC1 by Lena associated with a Th1 immune response polarization.

## *Introduction*

The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is responsible for huge economic losses in pig industry. PRRSV belongs to the *Nidovirales* order, the *Arteriviradae* family and the *Porartevirus* genus (ICTV 2017 Release). Two different species, PRRSV-1 and PRRSV-2 are now distinguished [1]. PRRSV-1 have further been divided into 4 subtypes. PRRSV-1 subtype 1 (PRRSV-1.1) is present in all part of Europe, while PRRSV-1.2, 1.3 and 1.4 are mostly present in Eastern Europe [2]. PRRSV-1.3 such as Lena, are more pathogenic than PRRSV-1.1 as Lelystad virus (LV) [3; 4; 5; 6]. The infection by PRRSV-1.3 is characterized by higher body temperature, more sever clinical signs and lung pathology compared to PRRSV-1.1, whereas viremia and lung viral load are not consistently higher [5; 7]. A lag of several weeks in the clearance of the PRRSV has been observed, mostly attributed to a delay in neutralizing antibodies appearance, although an inhibition of the cellular IFNγ response, less studied, might also be involved (for review see [8; 9]). It has been reported that virulent PRRSV-1.3 induced a strong early inflammatory response associated with an enhanced adaptive cellular immune response that may participate to their higher pathogenicity [5]. The main cellular targets of PRRSV are macrophages [10]. Extracellular sialoadhesin (CD169/Siglec-1) mediates viral internalization *via* interaction with viral protein GP5/M heterodimer while CD163 receptor plays a role in viral internalization and disassembly interacting with GP2 and GP4 viral proteins [11]. In addition to macrophages, other immune cells have been described to be permissive to PRRSV *in vitro*. Cultured blood monocytes, monocyte-derived dendritic cells (moDCs) [12] and bone marrow-derived dendritic cells (bmDC) [13] are susceptible to infection by a large range of PRRSV-1 strains. Nevertheless, *in vitro* differentiation conditions might strongly impact the susceptibility of DC/macrophages to PRRSV [14]. In 2013, Frydas et al. showed that virulent PRRSV-1.3 such as Lena were able, *ex vivo*, to infect a broader range of monocytic lineage subpopulations than LV PRRSV-1.1

[15].

Dendritic cells (DCs) and macrophages are mononuclear phagocyte cells (MPC) belonging to the mononuclear phagocyte system [16]. DCs are key inducers of adaptive immune responses, they migrate from infected tissues to lymph nodes in order to present antigens and induce the humoral and cellular adaptive immune responses. One running hypothesis is that the differences in pathogenicity of the PRRSV strains might be due to their differential abilities to infect or activate DCs, impacting the inflammatory response as well as the mounting of a protective adaptive immune response. Two studies tentatively tackled the lung DCs infection *in vivo* by PRRSV-1 and 2 respectively [17; 18]. However, none of them clearly defined nor distinguished DCs and macrophages, leading to results that cannot be clearly interpreted in terms of DCs/PRRSV interactions. We recently identified porcine respiratory DC and macrophage subpopulations and classified them according to a nomenclature proposed by Guilliams et al. [19; 20]. In accordance with knowledge in human and mice, we observed that porcine respiratory DCs presented migratory and naïve T-cell stimulation capacities. Conventional DC1 preferentially inducing a T-helper (Th) 1 response, cDC2 a Th2 response and monocyte-derived DC (moDC) a Th17 response. Moreover moDC produced inflammatory cytokines such as IL1 and IL8, and their proportion increased upon viral infection [21]. These populations represent *in vivo* differentiated respiratory DCs and macrophages which can be investigated for their interactions with PRRSV in their natural *in vivo* environment.

In order to explore the role of PRRSV/DCs interactions in the induction of the immune response, we studied the infection of primary lung DCs *in vivo* and *in vitro* as well as the impact of PRRSV infection on DCs functionalities. Highly virulent Lena PRRSV-1.3 was tested *in vivo* and compared *in vitro* with two PRRSV-1.1, namely LV and the newly emerging pathogenic Flanders13 (FL13) [15]. We found that primary lung DCs were not infected by any

of these strains and that a strong cDC1/Type 1 immune response was activated by Lena, but not by FL13 and LV.

## *Methods*

### *Virus production and titration*

The 3 strains of PRRSV used in this study were kindly provided by Dr. Hans Nauwynck, (University of Ghent, Belgium). The highly pathogenic Lena PRRSV-1.3 was used for *in vivo* and *in vitro* infections. Lena has been isolated in Belarus in 2007 from a herd with mortality, reproductive failures and respiratory disorders [22]. Lelystad virus was identified in the Netherlands in 1991 [23] and Flanders13 13V091 was isolated in Belgium in 2013 in farms experiencing uncommon long-lasting anorexia, fever and respiratory problems within the first two weeks after weaning during enzootic PRRSV infection.

Lena viral stock for *in vivo* experiment was produced using SPF piglets AM. The production was tested negative for PCV2, swine Influenza, Mycoplasma hyopneumoniae, classical swine fevers as well as African swine fever. A bacteria culture was also negative. For *in vitro* experiments, Lena, Fl13 and LV stocks were produced using fresh SPF primary alveolar macrophages. Supernatants from infected cells were clarified by centrifugation at 3,300G, filtered on 0.8µm. Then 30 ml of supernatant were layered on 4ml 17% sucrose cushion and centrifuged at 100,000G for 5h30min. The pelleted virus was resuspended in RPMI. Titration of viruses were performed on fresh primary alveolar macrophages using Spearman-Karber TCID50 method according to the OIE manual of diagnostic tests (OIE, "Chapter 2.8.7 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome," Terr. Man., no. May 2015, 2015.).

### *In vivo infection and tissue collection*

For in vivo experiment, PRRSV infection was performed at ANSES (Ploufragan, France). The

animal experiment was authorized by the French Ministry for Research (authorization no. 2015060113297443) and protocols were approved by the national ethics committee (authorization no. 07/07/15-3). Eight Large White piglets coming from a nucleus herd (free from PRRSV, *Actinobacillus pleuropneumoniae, Mycoplasma hyopneumoniae)* used as control in another publication [24], were housed in biosecurity level-3 air-filtered animal facilities. Treatments, housing, and husbandry conditions were conformed to the European Union Guidelines (Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes). At 10 weeks of age, 4 pigs were inoculated intranasally with Lena ($5.10^5$ TCID50/per animal in 2.5 ml per nostril). Ten days post infection, animals were anesthetized (Zoletil, Virbac, France) and exsanguinated. Broncho-alveolar lavage (BAL) cells were collected using 500 ml of PBS + 2 mM EDTA (PBS/EDTA) for each lung. After BAL procedure, peripheral parenchymal tissue from diaphragmatic lobes (PAR) were sampled, minced and incubated in complete RPMI consisting of RPMI 1640 medium supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 10% inactivated fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, Paisley, UK). Tissue digestion was performed by adding 2 mg/ml collagenase D (Roche, Meylan, France), 1 mg/ml dispase (Invitrogen) and 0.1 mg/ml Dnase I (Roche). Digested PAR was crushed and filtered on 100 µm cell strainers. Red blood cells were lysed using erythrolysis buffer (10 mM $NaHCO_3$, 155 mM $NH_4Cl$ and 10 mM EDTA) for 10 min at 37°C. Cells were washed in PBS/EDTA and frozen in FCS + 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

### *In vitro infection*

For *in vitro* experiments, lungs from conventionally bred Large White sows were obtained from a commercial slaughterhouse. All tested samples were negative for PRRSV. Cells were collected and processed as for *in vivo* experiments (section 2.2). Cell preparations were then

enriched in mononuclear phagocyte cells by 1.065 density iodixanol gradient (Optiprep®, Nycomed Pharma, Oslo, Norway) as previously described [25]. These gradient-enriched mononuclear phagocyte cell preparations will be further referred as gradient-enriched MPC. Infections (FL13, LV and Lena) were performed on fresh enriched MPC, 24h, in complete RPMI at MOI 0.5 suitable for the detection of cell infection using the anti-N intracellular staining and FACS analysis (see below). In order to avoid MPC adherence, incubations at 37°C were performed in Corning-Costar 50 ml polypropylene centrifuge tubes, with the cap drilled for air renewal. Two complementary negative controls were performed, inactivated Lena virus incubated at 37°C and live LV, FL13 and Lena viruses incubated with cells at 4°C for the whole 24h culture time.

For purified DC subtypes (cDC1, cDC2, moDC) and Macrophages (AM and AM-like) infection, cells were sorted as described in cell-sorting section (section 2.4). Then, Lena infections were performed in complete RPMI for 24 hours at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001, suitable for the detection of cell infection using the highly sensitive RT-qPCR method (section 2.5).

### *Cell sorting and flow cytometry analysis*

Isolated BAL and PAR cells were stained in blocking solution, composed of PBS/EDTA supplemented with 5% Horse Serum and 5% Swine Serum. Antibodies were added to the blocking solution for 30 min on ice and then washed in PBS/EDTA with 2% FCS (for antibodies refer to **Table 1**). Staining were made in 4 steps, the uncoupled primary antibodies of different species/isotypes (Chicken anti-CadM1, mouse IgG1 anti-CD172a, mouse IgG2a anti-CD1, mouse IgG2b anti-MHC-II) followed by the secondary species/isotype specific fluorochrome-coupled antibodies (anti-chicken-Alexa647, anti-mouse IgG1-Alexa488, anti-mouse IgG2a-PE-Cy7, anti-mouse IgG2b APC-Cy7), then the fluorochrome-coupled or biotinylated primary antibodies anti-CD163-PE, biotinylated anti-CD11c) followed by the streptavidin-coupled

Alexa700 fluorochrome. DAPI staining (Sigma-Aldrich) was performed to exclude dead cells. Compensations were set according to monocolor staining. When needed, fluorescence minus one (FMO) controls, using isotype control for the unstained channel, were used to ascertain the specificity of the staining (CD169, N, CD80/86, CD40, MHC-I, MHC-II expressions). MoFlo ASTRIOS sorter (Beckman-Coulter, Paris, France) was used to isolate specific cell subpopulations. FlowJo software (version 10.1.0, Tree Star, Ashland, OR) was used to analyze subpopulation prevalence. Population prevalence is expressed as percentage of MHC-$II^{high}$/$CD11c^{pos}$ cells. Cells were analyzed using an LSRFortessa cytometer and Diva software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey).

For intracellular virus detection, cells were stained using the same strategy as for cell-sorting. An additional intracellular staining step was performed using BD Cytofix/Cytoperm™ (Becton-Dickinson, Belgium), according to the manufacturer's instructions using an antibody against viral N protein (mouse IgG1, clone BIO 276, Bio-X Diagnostic) and a secondary anti-IgG1-PerCP-e710. In this case anti-MHC-II MSA3 (mouse IgG2a) and anti-CD172a 74-22-15a (mouse IgG2b) primary antibodies instead of Th21A and 74-22-15 respectively, as well as directly coupled CD1-FITC were used.

**Table 1: Antibodies used for MPC cell sorting and infection analysis by flow cytometry**

| Antibody | Clone | Isotype | Specie | Dilution | Supplier |
|---|---|---|---|---|---|
| **CadM1** | 3E1 | IgY | Chicken | 250 | MBL |
| **CD11c** | 3A8 | IgG1 | Mouse | 100 | Homemade |
| **CD11c-biot** | 3A8 | IgG1 | Mouse | 100 | Homemade |
| **CD163-PE** | 2A10/11 | IgG1 | Mouse | 20 | Biorad |
| **CD172a/Sirpα** | 74-22-15 | IgG1 | Mouse | 250 | WSU |
| **CD172a/Sirpα** | 74-22-15a | IgG2b | Mouse | 250 | WSU |
| **CD1** | 76-7-4 | IgG2a | Mouse | 125 | WSU |
| **CD1-FITC** | 76-7-4 | IgG2a | Mouse | 125 | Southern Biotech |
| **MHCII (SLAII)** | MSA3 | IgG2a | Mouse | 250 | WSU |
| **MHCII (SLAII)** | Th21A | IgG2b | Mouse | 250 | WSU |
| **Viral protein N** | BIO276 | IgG1 | Mouse | 1/30 | Bio-X Diagnostic |

### *RNA extraction and RT-qPCR on sorted cells*

Total RNA from sorted cells was extracted using the Arcturus PicoPure RNA Isolation kit (ThermoFisher Scientific, St Aubin, France) according to the manufacturer's instructions. The RNase-Free DNase Set (Qiagen, France) was used to remove contaminating DNA. Reverse transcription was made using Multiscribe reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific) according to manufacturer's instructions. Relative mRNA expression was evaluated by qPCR using the iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA). Relative gene expression was assessed according to ΔCt method. *Ribosomal protein S24* (*RPS24*) and *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH)* were used as reference genes as previously described in pig lung [21; 26]. For viral transcripts, primers were designed on the Lena protein N nucleocapsid sequence. In all *in vivo* and *in vitro* infection, data were normalized on *RPS24* and *GAPDH* reference genes, previously tested for stable expression among MPC subsets and upon PRRSV infection (data not shown). Since normalization with *RPS24* or *GAPDH* gave similar results, only *RPS24* normalization is depicted in the figures 4, 5, 6 and supplementary 1. Primers used are described in **Table 2**. Titration of viral particles using RT-qPCR detection, set a limit of detection <1,000 particles (Ct<35).

## Table 2: Primers used for RT-qPCR

| Gene | Sequences (5'-3') | Gene ID | Size | Efficiency |
|---|---|---|---|---|
| ***FcεRIα*** | F : CAGGTGTCCTTGAATCCCCC<br>R : GGCATCTGTATTTGCCGCTG | 100152827 | 74 bp | 1.07 |
| ***FOXP3*** | F : GGTGCAGTCTCTCTGGAACAA<br>R : GGTGCCAGTGGCTACAATAC | 444998 | 148 bp | 1.10 |
| ***GATA3*** | F : GTCTAGCAAATCCAAAAAGTGCAA<br>R : GGGTTGAACGAGCTGCTCTT | 733631 | 75 bp | 1 |
| ***GAPDH*** | F : CACCATCTTCCAGGAGCGAG<br>R : CCAGCATCACCCCACTTGAT | 396823 | 51 bp | 1 |
| ***IFNα*** | F : TCTGCAAGGTTCCCAATGG<br>R : GGCATTGCAGCTGAGTAGCA | 397686 | 69 bp | 0.93 |
| ***IFNβ*** | F : TGTGGAACTTGATGGGCAGA<br>R : GAATGGTCATGTCTCCCCTGG | 445459 | 92 bp | 0.98 |
| ***IFNγ*** | F : TGGTAGCTCTGGGAAACTGAATG<br>R : TGGCTTTGCGCTGGATCT | 396991 | 79 bp | 1.01 |
| ***IL4*** | F : GCCGGGCCTCGACTGT<br>R : TCCGCTCAGGAGGCTCTTC | 397225 | 68 bp | 1.06 |
| ***IL6*** | F : CTGCTTCTGGTGATGGCTACTG<br>R : GGCATCACCTTTGGCATCTT | 399500 | 69 bp | 0.94 |
| ***Il8*** | F : TCCTGCTTTCTGCAGCTCTCT<br>R : GCACTGGCATCGAAGTTCTG | 396880 | 71 bp | 0.72 |
| ***IL10*** | F : GAGCCAACTGCAGCTTCCA<br>R : TCAGGACAAATAGCCCACTAGCTT | 397106 | 65 bp | 1.01 |
| ***IL12p35*** | F : CGTGCCTCGGGCAATTATAA<br>R : CAGGTGAGGTCGCTAGTTTGG | 397053 | 66 bp | 0.99 |
| ***IL12p40*** | F : GGAGCACCCCACATTCCTACT<br>R : TTCTCTTTTGTTCTTGCCCTGAA | 397076 | 68 bp | 0.98 |
| ***IL13*** | F :CTGACCACCAGCATGCAGTACT<br>R : CGCTGGCAGTCGGAGATGTT | 396721 | 59 bp | 0.93 |
| ***IL17*** | F : CCAGACGGCCCTCAGATTAC<br>R : GGTCCTCGTTGCGTTGGA | 449530 | 65 bp | 0.98 |
| ***IL21*** | F : AAATAGTCATCTGCCTGATGGTCAT<br>R : AGGCGATCTTGTCCTTGGAA | 403123 | 76 bp | 1 |
| ***MerTK*** | F : CCGAACTCTGTAATCGCTTCTTG<br>R : TGCACTTCCGCCGTGACTA | 100519652 | 65 bp | 0.74 |
| ***N* Lena** *viral RNA* | F : ATGGCCAGCCAGTCAATCAG<br>R : GGAACGTTCAGTTCCGGTGA | 1494888 | 166bp | 0.95 |
| ***N* FL13** *viral RNA* | F : GGGAATGGCCAGTCAGTCAA<br>R : ATCTTCAGCAGCTAGGGGGA | 1494888 | 134bp | 0.95 |
| ***RORγt*** | F : CCTGGCCCTGGGCATGT<br>R : TGTTCTAGCAGCGTCCGAAGT | 100622477 | 138 bp | 1.09 |
| ***RPS24*** *ref. gene* | F : AAGGAACGCAAGAACAGAATGAA<br>R : TTTGCCAGCACCAACGTTG | 100155012 | 62 bp | 0.98 |
| ***T-bet*** | F : TGCAGTCCCTCCATAAGTACCA<br>R : GCCTCTGGCTCACCATCATT | 100518804 | 67 bp | 0.81 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ***TGFβ*** | F : GAAGCGCATCGAGGCCATTC<br>R : GGCTCCGGTTCGACACTTTC | 397078 | 162 bp | 0.85 |
| ***TNFα*** | F : TGGTGGTGCCGACAGATG<br>R : CAGCCTTGGCCCCTGAA | 397086 | 64 bp | 0.96 |
| ***XCR1*** | F : CGATGCCGTCTTCCACAAG<br>R : GGAACCACTGGCGTTCTGA | 414375 | 61 bp | 1.01 |

### *Maturation markers surface expression*

Expression of CD80/CD86, CD40, MHC-I and MHC-II on DCs were studied by flow cytometry. Gradient-enriched MPC were cultured for 24 or 48 hours with PRRSV (FL13, LV and Lena) at MOI 0.5. For CD80/CD86 staining, the protein expressed by the human recombinant CD152 gene genetically fused with the Fc portion of the murine IgG2a sequence was used (Ancell, Bayport, MN, USA) (see **Table 3**).

**Table 3: Antibodies used for maturation markers expressions and allogeneic lymphocytes proliferation assays**

| Antibody | Clone | Isotype | Specie | Dilution | Supplier |
|---|---|---|---|---|---|
| **CD152-muIg (CTLA-4)** | | IgG2a | Mouse | 50 | Ancell |
| **CD40** | G28.5 | IgG1 | Mouse | 25 | Genetex |
| **MHC-I** | JM1E3 | IgG1 | Mouse | 50 | BioRad |
| **CD3** | 8E6 | IgG1 | Mouse | 100 | WSU |
| **CD4** | 74-12-4 | IgG2b | Mouse | 100 | WSU |

### *Mixed Lymphocytes Reaction assay*

Mixed Lymphocytes Reaction (MLR) assays were performed as previously described [27]. Briefly, fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from Melanoma Libechov Mini pigs were isolated on Ficoll-Paque density gradient (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Fresh parenchymal gradient-enriched MPC were cultured at $1.10^6$ cells/ml for 24 hours with PRRSV (FL13, LV and Lena) at MOI 0.5 in complete RPMI. Following tests at different MPC:PBMC ratio (from 1:2 to 1:12), the 1:6 ratio has been selected for fresh MPC:PBMC final

co-culture, with final total cell concentration of 2 x $10^6$ per ml in complete RPMI**.** After 3 days of co-culture, total RNA was extracted and gene expression were analyzed by RT-qPCR. Four transcriptions factors (*T-bet*, *GATA3*, *RORγT* and *FOXP3*) and cytokines (*IFNγ*, *IL13*, *IL17* and *TGFβ*) expression were chosen as indicators of T-helper polarization (respectively Th1, Th2, Th17 and Treg). *IL13* has been chosen instead of *IL4* because *IL13* has been reported as a better porcine Th2 marker than *IL4[28]*. Data were normalized as described above in the RT-qPCR section. The same PBMC were CFSE stained and co-cultured with allogeneic infected gradient-enriched MPC in order to evaluate their proliferation rate. After 5 days of culture cells were stained using anti-CD3 and CD4 antibodies (**Table 3**) and their corresponding isotype-specific secondary antibodies and analysed on LSR Fortessa flow cytometer.

### *Cytokine Bead Assay*

In order to measure production of cytokines by MPC in response to infection, gradient-enriched MPC were infected with PRRSV (FL13, LV and Lena) for 24 hours at MOI 0.5 in complete RPMI and supernatants were collected. Cytokine production was measured by Cytokine Bead Assay (CBA) as previously described [21], using capture and detection antibodies combinations described in **Table 4**.

### *Statistical analysis*

All data were analyzed using R software (version 3.4.0) upgraded with FactoMineR package (version 1.39) [29]. Non-parametric approaches were chosen due to the few number of samples available. The Mann-Whitney's test was used to compare unpaired samples based on ranking. For paired samples, the Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used. Statistical tests and *p*-values are indicated in the relevant figure legends. MPC cytokine profile after *in vivo* infection of pigs were analyzed using Principal Component Analysis method (PCA). PCA

multivariate analysis is a dimension-reduction tool that permit to reduce a large set of variables to a smaller one which still contains most of the information. A first PCA analysis was performed on BAL and PAR subpopulations in order to validate subpopulation clusters. Regarding quality and quantity of RNA, only 3 out of 4 cell-sorting samples were included for cytokine expression analysis. A second PCA analysis was performed on cytokines expressions from the 3 DCs populations and the 2 tissues (PAR and BAL) separately.

**Table 4: Antibodies used for CBA**

| Cytokine | Capture antibodies | | Detection antibodies (biotinylated) | |
|---|---|---|---|---|
| | **Clone** | **Supplier** | **Clone** | **Supplier** |
| **IL-1β** | 77724 | R&DSystems | pAb (#BAF681) | R&DSystems |
| **IL-2** | A150D3F1 | Invitrogen | A150D8H10 | Invitrogen |
| **IL-4** | A155B16F2 | Invitrogen | A155B15C6 | Invitrogen |
| **IL-6** | pAb (#AF686) | R&DSystems | pAb (#BAF686) | R&DSystems |
| **IL-8** | 105105 | R&DSystems | pAb (#BAF535) | R&DSystems |
| **IL-10** | 148801 | R&DSystems | 945A1A926C2 | Invitrogen |
| **IL-12** | G9 | KingfisherBiotech | 116211 | R&DSystems |
| **IL-13** | pAb (#PB0094S) | KingfisherBiotech | pAb (#PBB0096S) | KingfisherBiotech |
| **IL-17** | pAb (#KP0498S) | KingfisherBiotech | pAb (#KPB0499S) | KingfisherBiotech |
| **TNFα** | 103104 | R&DSystems | 103302 | R&DSystems |
| **IFNα** | F17 | R&DSystems | K9 | R&DSystems |
| **IFNγ** | A151D5B8 | Invitrogen | A151D13C5 | Invitrogen |

## *Results*

### Dendritic cells are not infected *in vivo* and *in vitro* by Lena

Thanks to our previous work defining the phenotype and functions of the pig lung DC populations (cDC1, cDC2 and moDC) [21] we were able to refine our gating strategy in order to define each population by 4 to 5 different criterions, thus rendering our gating less sensitive to inflammation-induced markers modifications (**Figure 1A**). We used our newly described anti-CD11c antibody to gate myeloid cells [30]. Conventional DC1 previously defined as MHC-II$^{high}$/CD163$^{neg}$/CD172a$^{neg/low}$ will be defined here as MHC-II$^{high}$/CD163$^{neg}$/CD172a$^{neg/low}$/CD11c$^{pos}$/CadM1$^{pos}$ (**Figure 1A**). Conventional DC2 previously defined as MHC-II$^{high}$/CD163$^{neg}$/CD172a$^{pos}$ will be defined here as MHC-II$^{high}$/CD163$^{neg}$/CadM1$^{pos}$/CD1$^{pos}$ (**Figure 1A**) to comply with cDC2 definition in other tissues [27; 31]. Conventional DC1 and cDC2 were negative for the two known PRRSV receptors CD163 and CD169 (**Figure 1B**), at steady state and upon infection. Monocyte derived-DC previously defined as MHC-II$^{high}$/CD163$^{low}$/CD172a$^{pos}$ will be defined here as MHC-II$^{high}$/CD163$^{low}$/CD172a$^{pos}$/CD11c$^{high}$ (**Figure 1A**). CD163$^{high}$/CD11c$^{high}$ macrophages from broncho-alveolar lavage (BAL) and parenchyma (PAR), called AM [21] and AM-like/PIM [32] respectively were collected and used as positive control of infection in the following experiments. Monocyte-derived DC, AM-like/PIM and AM expressed CD169 and CD163 (**Figure 1B**), although moDC expressed lower level of CD163 as previously observed. AM [33] and PIM/AM-like [32] have been described to be the main PRRSV target cells, but they are unable to activate naïve T helper cells [21]. This gating strategy was validated by cell-sorting of lung MPC upon mock and PRRSV infection and RT-qPCR of population specific genes (**Supplementary Figure S1A**). In both mock and infected animals, cDC1 exclusively presented a strong *XCR1* expression, whereas cDC2 presented a high *FcεRIα* expression, thus validating

the cDC1 and cDC2 gating. We couldn't validate the moDCs sorting since no specific moDCs marker has been reported so far, neither in mouse [34; 35; 36] nor in human [37; 38] and swine [14; 21]. As expected, *MerTK* was present in AM-like/PIM and AM. Surprisingly, in mock infected animals, steady state moDCs did not express *MertK*, whereas in our precedent experiments we observed variable *MertK* expression in moDC [21; 26]. The discrepancy might originate from the use, here, of animals reared in highly controlled environment, whereas our previous studies were conducted using conventional animals. Indeed, upon Lena infection, we observed MertK upregulation in moDC (Supplementary Figure S1A), in concordance with a MertK upregulation in moDC in infectious conditions, although this hypothesis would need further validations. Since PRRSV is known to be cytolytic for infected cells, the evolution of each MPC population upon *in vivo* Lena infection was measured. Since the absolute number of MHC-II$^{high}$/CD11c$^{pos}$ MPC did not vary significantly among samples (PAR: $44.5.10^6$ +/- $5.2.10^6$ cells in control animals versus $40.8.10^6$ +/- $4.6.10^6$ cells in infected animals; BAL: $44.1.10^6$ +/- $9.2.10^6$ cells in control animals versus $41.0.10^6$ +/- $4.4.10^6$ cells in infected animals), the percentage of each MPC subtypes among MHC-II$^{high}$/CD11c$^{pos}$ cells was compared. Conventional DC1 and cDC2 proportions were not modified, whereas moDCs showed a trend to increase in parenchymal tissue (**Figure 2A**), and increased significantly in the alveolar lavages (**Supplementary Figure S1B**), in agreement with the pro-inflammatory infectious context. As previously observed (Bordet, submitted), AM-like and AM proportions were strongly decreased (**Figure 1A**). The same cell populations were then sorted and viral RNAs were detected using RT-qPCR. The clear decrease of AM and AM-like proportions was concomitant with the detection of viral RNA. No significant viral RNA was observed in the 3 parenchymal DCs populations (**Figure 2B**) as well as in their alveolar counterparts (**Supplementary Figure S1C**).

To comfort these *in vivo* results, we cell-sorted the MPC of uninfected animals, and infected the cell populations *in vitro* at low MOI. AM and AM-like cultured with inactivated Lena were used as negative control for BAL and PAR respectively. After 2 days of culture, viral transcripts in the cell pellet as well as infectious virions in the culture supernatant were titrated by RT-qPCR and TCID50 methods respectively. Whereas AM-like and AM gave clear positive signals, no significant differences were observed between DCs and the negative controls with both detection methods (**Figure 2C and 2D**). This set of data clearly demonstrated, both *in vivo* and *in vitro,* that none of the 3 subsets of DCs were infected by Lena.

**DCs are not infected *in vitro* by FL13 and LV**

Lena tropism was compared with that of FL13 and LV. An original *in vitro* model of infection using gradient enriched MPC was established. This method allows to keep the lung MPC complexity in an easy to handle cell suspension culture. After 24 hours (an incubation time at which the cytopathic effect of PRRSV infection is not yet observed), viral infection was detected using an intracellular staining of viral N protein associated with the previously used MPC staining and gating (**Figure 1**). This model was validated by performing Lena infection and asserting the correlation between the levels of viral RNA by RT-qPCR (**Figure 2)** and N intracellular staining (data not shown). Controls with inactivated virus and 4°C incubated virus were performed (**Supplementary Figure S2**). For all strains, AM and AM-like presented N protein expression (**Figure 3**), validating the replication previously observed by RT-qPCR. In agreement with the previous *in vivo* and *in vitro* data, the viral protein was not detected in cDCs neither in PAR (**Figure 3**) nor in BAL (data not shown) for the 3 strains. In contrast with our *in vivo* and *in vitro,* cell sorted infection data (**Figure 2A and 2B**); using MPC mixed *in vitro* culture, a small but significant proportion (under 5%) of moDCs were N positive upon Lena, but not LV and FL13 infections (**Figure 3 and Supplementary Figure S2**).

**Lena but not FL13 and LV triggers a Th1 response *in vitro*.**

The resistance of DCs to PRRSV infection did not rule out a functional impairment of DCs by PRRSV, either through an early abortive infection or by an indirect bystander action. In order to test DCs functionalities upon PRRSV-1.1 and 1.3 infections, we used our *in vitro* infectious system to probe the complex action of the 3 strains on the whole lung MPC.

Production of cytokines by parenchymal MPC after infection was evaluated by Cytokine Bead Assay. IL12 and at a lesser extend IFNγ releases were significantly increased upon Lena but not LV and FL13 infections (**Figure 4**). No significant differences between viruses were observed for IL8, TNFα, IL4, IL6, IL13 and IL17. Maturation of DCs were tested *in vitro* by monitoring CD80/86, CD40, MHC-I and MHC-II expressions by FACS analysis. No difference between strains appeared in these experiments (**Supplementary Figure S3A**).

In order to analyze the ability of the pooled infected MPC to induce a T cell response, MLR assays were performed. MPC infected with any of the 3 strains induced a similar proliferation of CD4 T cells (**Supplementary Figure S3B**) in agreement with the absence of maturation markers expression differences. Using the same settings, we investigated more subtle functional differences by looking at the induction of T helper (Th) differentiation bias by measuring transcription factors and cytokines mRNA expressions after 3 days of allogeneic culture. Contrary to LV and FL13 infected MPC, Lena infected MPC showed a clear Th1 profile characterized by a higher expression of *T-bet* and *IFNγ* (**Figure 5**), in agreement with the detection of IL12 and IFNγ cytokines. Lena infection also triggered a significant *GATA-3* expression, paralleled with a non-significant *IL13* upregulation. Interestingly, in our settings no Treg nor Th17 induction was observed with any of the 3 strains.

**Lena infection *in vivo* activates the Th1-inducer cDC1**

Since DCs are the only activator of naïve T cells, and given the clear Th1 profile detected with

Lena infection *in vitro,* we investigated DCs subpopulations' activation *in vivo*. We assessed the cytokines mRNA expression levels of sorted DCs from 10 days mock and Lena infected animals. The expressions data were analyzed in a first PCA (**Supplementary Figure S4**). MPC subpopulations clearly segregated on the two first axis regardless of tissue (PAR versus BAL) and infection status, thus clearly validating our sorting strategy.

Analysis of individual cytokines expression indicated trends of upregulation in cells from Lena infected animals for *IFNα, IL12p35, IL12p40, IL8* and *TNFα* in cDC1, upregulation of *TGFβ* in cDC2 and upregulation of *IL12p40* in moDCs. In AM-like *TGFβ* was upregulated and *IL10* was down-regulated (**Figure 6**). These data were then analyzed globally in a second PCA analysis which showed a clear change in cDC1 cytokines profile under infectious conditions in PAR and BAL samples (**Figure 7**). For cDC2 and moDCs no clear differences were observed. It should be noticed that the same analysis in AM and AM-like gave no clear separation between cells from mock or infected animals (data not shown).

### *Discussion*

Here, *in vitro* and *in vivo* experiments were developed to study the interactions of lung DCs with different PRRSV-1. Our results demonstrate that the two types of cDCs (cDC1 and cDC2) are not infected by PRRSV-1. Using the MPC mix culture model, moDCs appeared susceptible, although weakly, to Lena, but not to PRRSV-1.1 infections whereas *in vivo* infected and freshly purified moDCs were not. One possible explanation is that monocytes present in lung MPC became sensitive to Lena infection upon culture as previously described for PRRSV2 [39] and then differentiated in moDCs in the course of *in vitro* culture in inflammatory conditions. This would explain contradictory results reported according to Lena infections experiments using MPC *ex vivo* or *in vitro* [14; 15; 40] as they might greatly depend upon the *in vitro* culture conditions. Although we were unable to identify and isolate lung plasmacytoid DCs (pDCs), a

previous report on blood pDCs demonstrated that pDCs were also resistant to PRRSV infections [41]. Thus, according to our *in vivo* and *in vitro* data, we can confidently state that none of the known DCs subtypes of the porcine lung can be consistently infected by PRRSV-1.

The resistance to PRRSV infection of *in vivo* differentiated cDCs appears in line with the absence of expression in these cells of the two main PRRSV receptors CD169 and CD163 (**Supplementary Figure S1D and S1E**) [21]. To note, Siglec-10 has been recently described as a possible alternative to CD169 (Siglec-1) receptor [42]. However Siglec-10 expression seems restricted to B cells [43], and would not compensate for the absence of CD163 expression on cDCs, CD163 being so far the only receptor whose deletion totally abrogates *in vivo* PRRSV replication [44; 45]. Conversely, *in vivo* differentiated moDCs expressed CD169 (**Supplementary Figure S1D**) and low levels of CD163 (**Figure 1** and [21]) that might be upregulated upon *in vitro* culture, which would explain the infection of moDCs depending on culture conditions and PRRSV type.

In Lena infected animals, the absence of DCs infection did not preclude the cDC1 activation and the development of an antiviral Th1 immune response. This is in agreement with the role of cDC1 in the antiviral Th1/T CD8 inducing response, as previously observed in porcine [21] and murine ($CD103^{pos}$ DCs) [46; 47] respiratory tracts. Lung mouse cDC1 ($CD103^{+}$) have been shown to be resistant to Influenza virus infection while cross-presenting efficiently viral antigens to T cells [48]. Moreover it has been recently demonstrated that human cDC1 were resistant to infection by endocytic enveloped viruses such as HIV and Influenza but relied on viral antigens produced by bystander cells that they can cross-present to trigger T cell responses [49]. In the case of PRRSV, those antigens might come from apoptotic infected macrophages. Indeed cDC1 from murine lung ($CD103^{pos}$ DCs) [50] and from pig skin ($CD172a^{neg/low}$ dermal DCs)[25] preferentially phagocytosed apoptotic bodies. Activation of porcine cDC1 can be

triggered through TLR8 [31] which is activated by single-strand RNA viruses [51] or through the accumulation of late apoptotic/secondary necrotic, pro-inflammatory AM that might accumulate in the lung (for review see [52]). This bystander activation of cDC1 can be compared to the previously described *in vitro* activation of pDCs [53] by PRRSV-infected macrophages. We can thus speculate that Lena-infected apoptotic AM are taken over by cDC1 that get activated by virus-laden apoptotic bodies. Conventional cDC1 then activate the Th1/TCD8 immune responses. We have to stress here that our data used allogeneic induced responses, but did not formally demonstrate PRRSV-specific antigen presentations. However, interestingly, the Th1 immune response induced by PRRSV-1.3 has been correlated with the clinical score [5] suggesting that the antigen-specific anti-PRRSV Th1 response would be involved in the higher pathogenicity of PRRSV-1.3 strains. Whereas this Lena-triggered cDC1 activation appears finally quite classical, we would like to stress that the converse lack of cDC1/Th1 activation with PRRSV-1.1 viruses might indeed deserve more attention.

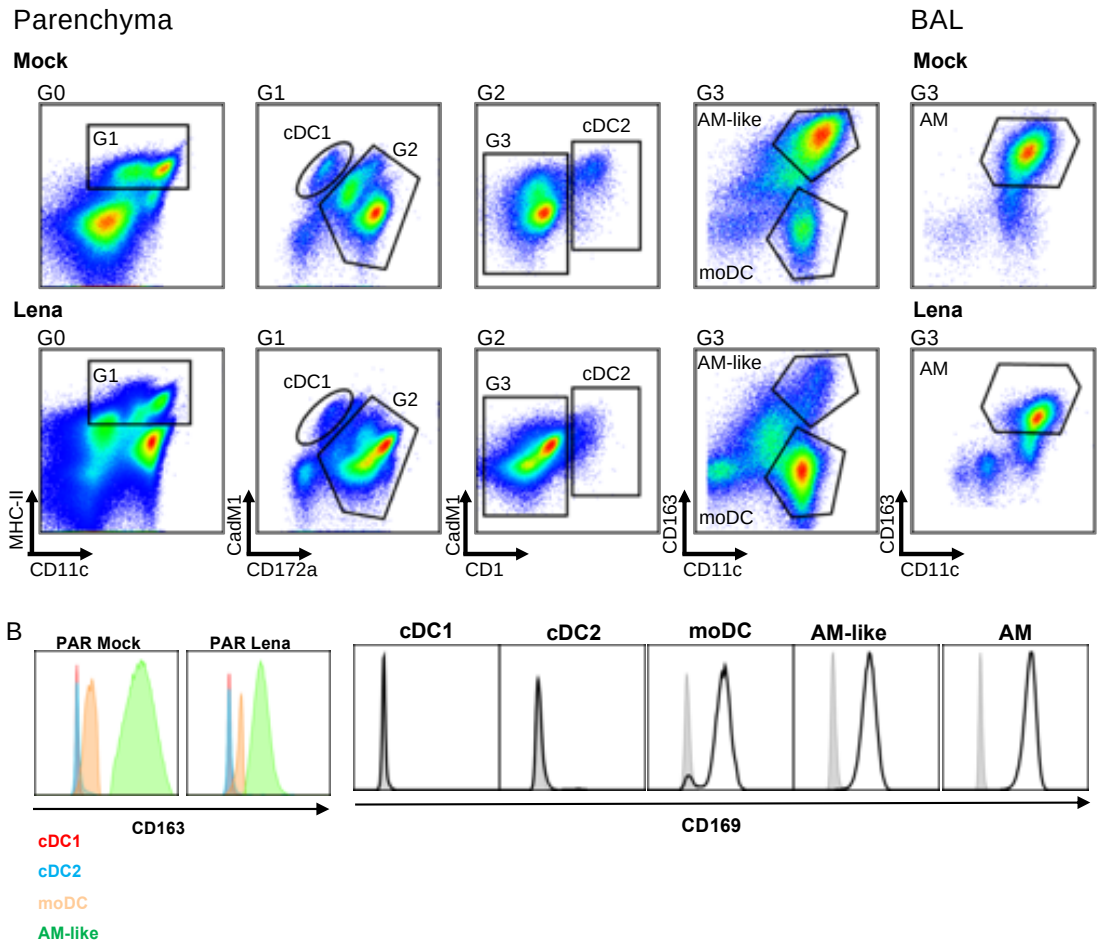



**Figure 1 : Mononuclear phagocytes (MPC) cell-sorting strategy**

**A**) Type 1 and Type 2 conventional dendritic cells (cDC1 and cDC2 respectively), monocyte-derived DCs (moDCs) and alveolar macrophages-like cells (AM-like) were isolated in infected or mock-infected lung parenchyma (PAR). MPC were defined by using MHC-II/CD11c/CD172a/CadM1/CD1 and CD163 markers. Identical process was performed on broncho-alveolar lavage (BAL) to collect alveolar macrophages (AM). Each graph is the offspring of the previous gate from left to right. Gates are numbered as G0 to G3. Data are representative of 4 independent cell-sorting experiments. (**B**) CD169 expression in MNP (Open black histogram) compared to isotype control (Closed grey histogram) and CD163 expression in MNP. Since CD163 is used in the gating of the different MNP populations, isotype control cannot be included.

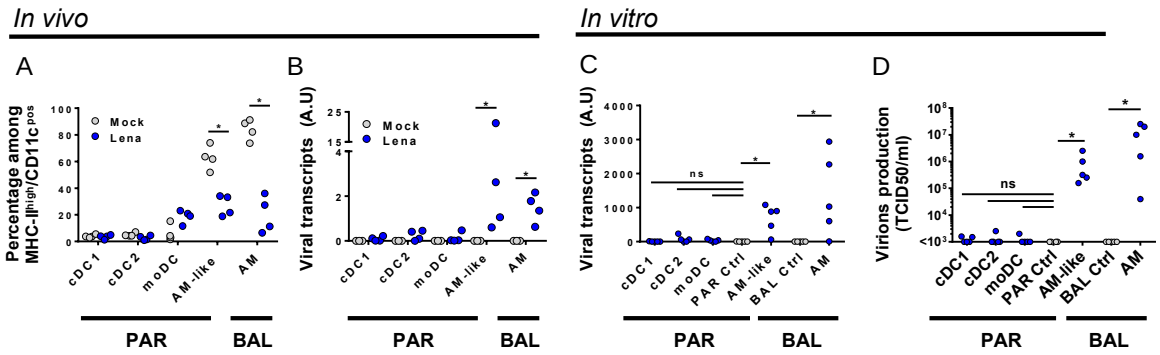



**Figure 2. DCs are not infected by Lena *in vivo***

**(A)**. Percentage of MPC were monitored in mock (Grey circle, 4 animals) and infected (Blue circle, 4 animals) BAL and lung parenchyma (PAR) after immunostaining. Data are expressed as a percentage of MHC-II$^{high}$/CD11c$^{pos}$ cells (see Gate1 in figure 1.A). The Mann-Whitney's test was performed. *P-values* *$<0.05$. **(B)** Detection of viral transcripts on sorted MPC was assessed by RT-qPCR. Primers designed on viral Nucleocapsid protein (N) were used to detect viral transcripts. Arbitrary unit: A.U. represents $2^{-\Delta Ct}$. The Mann-Whitney's test was performed. *P-values* *$<0.05$. (**C&D)** MPC from conventional pigs were isolated by cell sorting and infected *in vitro* for 24 hours with Lena at multiplicity of infection (MOI) $10^{-3}$. AM and AM-like cultivated with inactivated virus were defined as PAR and BAL controls (PAR Ctrl and BAL Ctrl) respectively. **(C)** Intracellular viral transcripts were detected by RT-qPCR. **(D)** Production of infectious virions were detected by titration of supernatants on fresh AM, according to TCID50/ml method. Data are representative of 5 independent experiments. Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed. *P-values* *$<0.05$.

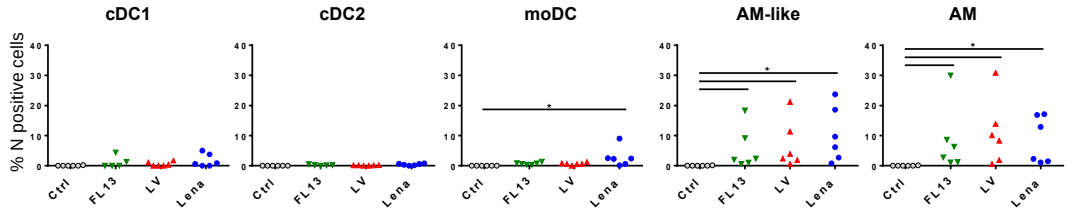



**Figure 3. DCs are not infected by Lelystad and Flanders13 *in vitro***

MPC enriched parenchymal cells were infected for 16 hours at MOI 0.5 with Flanders13 (FL13, Green triangle), Lelystad (LV, Red triangle) and Lena (Blue circle) strains. Mock-infected MPC were used as control (Ctrl). The cells were stained and gated as in Figure 1, except the additional step of an intracellular viral N protein staining. Data are representative of 6 independent experiments. Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed. *P-values* *$<0.05$.

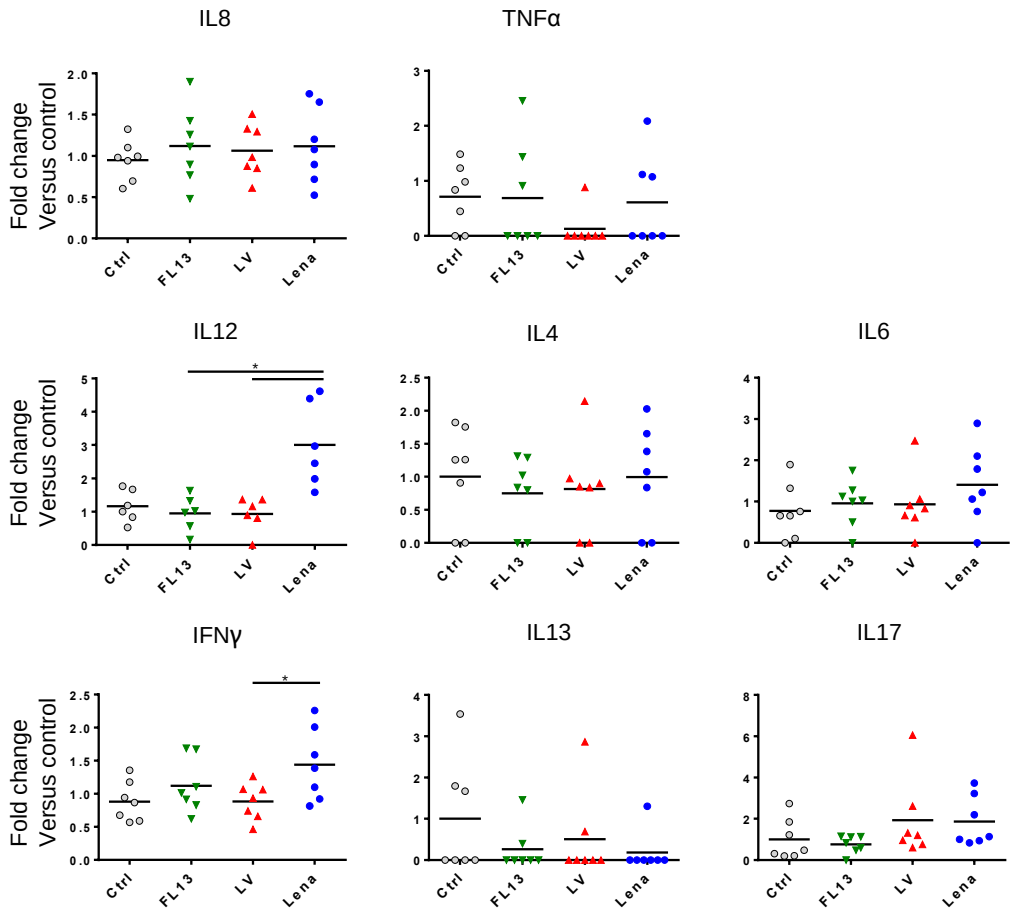



**Figure 4. MPC Lena virus infection induces IL12A and IFNg secretions**

MPC enriched PAR were cultured for 24 hours at MOI 0.5 with FL13 (Green triangle), LV (Red triangle) and Lena (Blue circle) in complete RPMI. Supernatants were collected and analyzed by Cytokine Bead Assay (CBA). Data were normalized as fold change relative to control. The control samples mean has been calculated for each cytokine, then, each sample value, including the control sample values used for the reference mean calculation, is individually expressed as a percentage of this mean. Wilcoxon test was performed. *P-values* *<*0.05.*

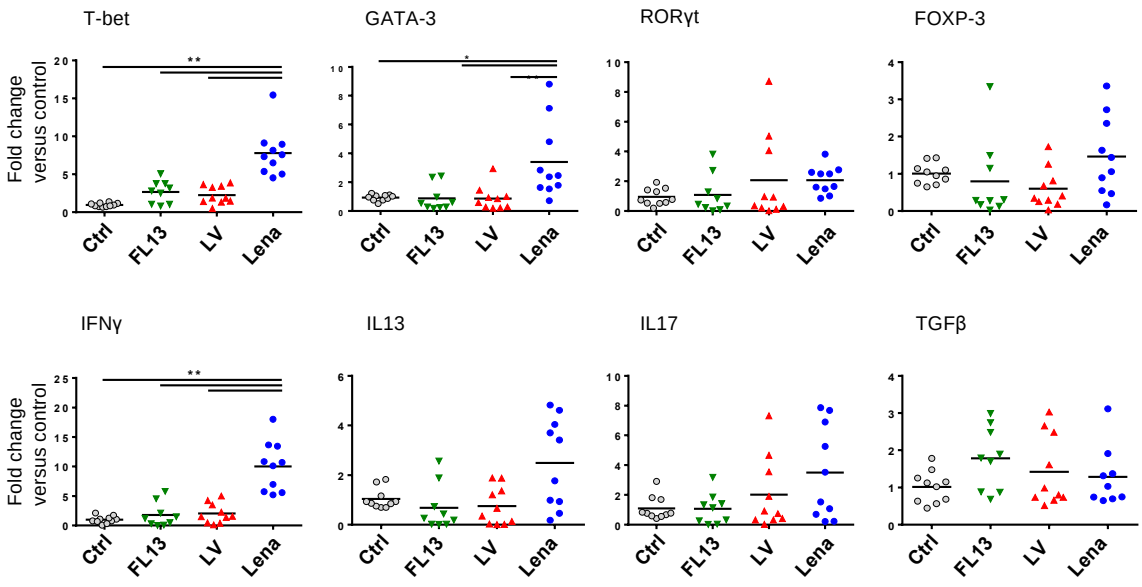



**Figure 5. Lena infected MPC trigger a stronger Th1 response than LV and FL13**

MPC-enriched PAR were cultured for 24 hours with FL13 (Green triangle), LV (Red triangle) or Lena (Blue circle) at MOI 0.5 and then co-cultured with allogeneic PBMC at ratio 1:6. After 3 days of co-culture, RNA were extracted and gene expressions were analyzed by RT-qPCR. Four transcriptions factors (*T-bet*, *GATA3*, *RORγT* and *FOXP3*) and cytokines (*IFNγ*, *IL13*, *IL17* and *TGFβ*) expressions were chosen as indicator of respectively Th1, Th2, Th17 and Treg polarization. Data were normalized to the reference gene *RPS24* expression and expressed as fold change relative to control. The control samples mean has been calculated for each cytokine, then, each control sample is expressed as a percentage of this mean. Wilcoxon test was performed. *P-values *<0.05; **<0.005.*

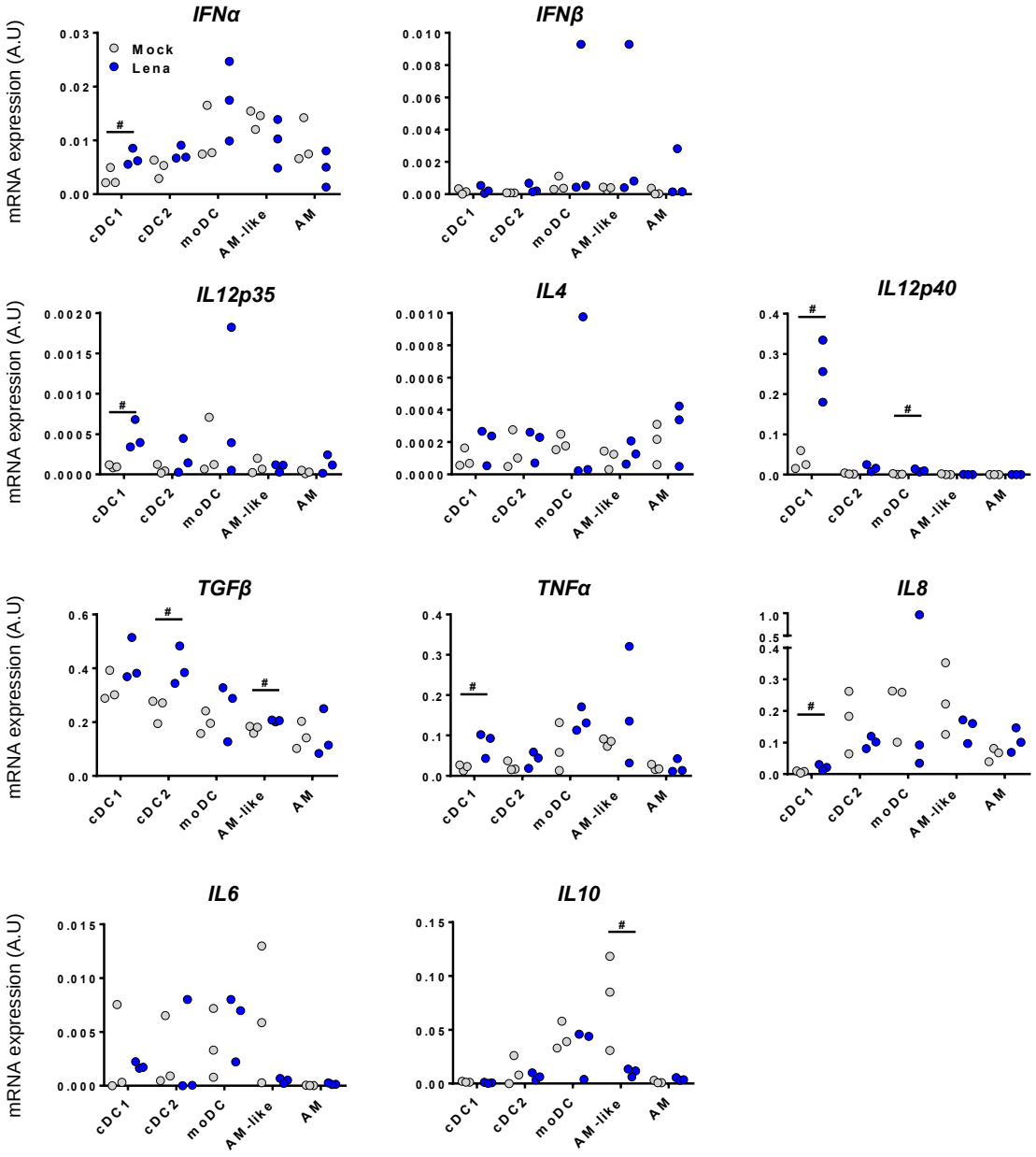



**Figure 6. Lena infection triggers differential cytokines responses according to DCs subpopulations**

Cytokines mRNA expressions in MPC from mock (Grey Dots) or *in vivo* infected (Blue Dots) PAR and BAL were studied by RT-qPCR after cell-sorting. Data were normalized to the reference gene *RPS24* expression. Data are representative of 3 independent experiments. Ranking tests were performed. Symbol "#" highlights when the infected animals were all upper or lower than the controls.

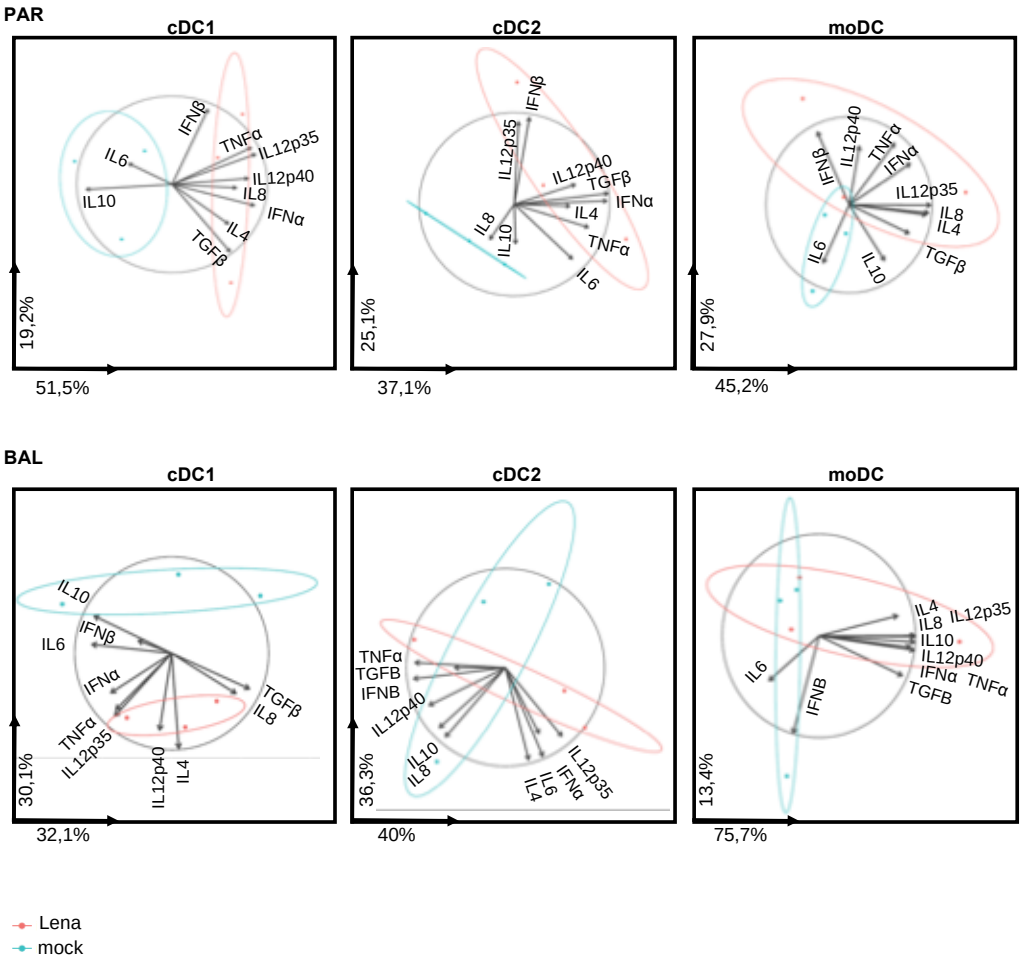
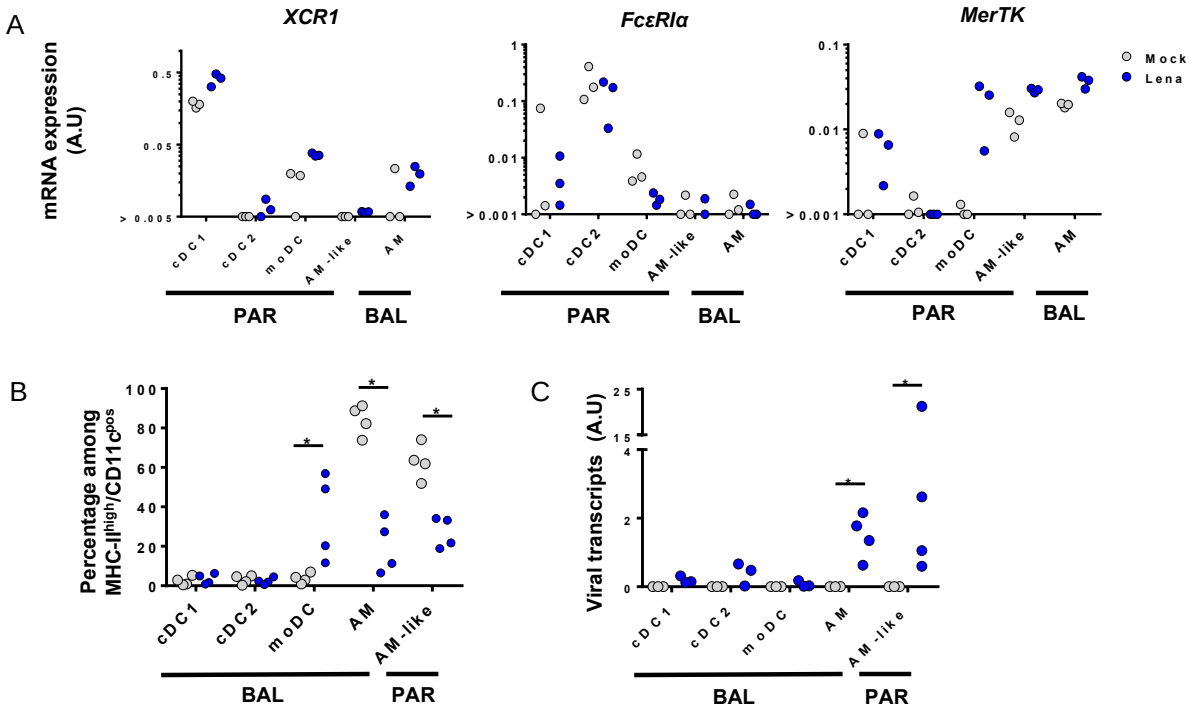
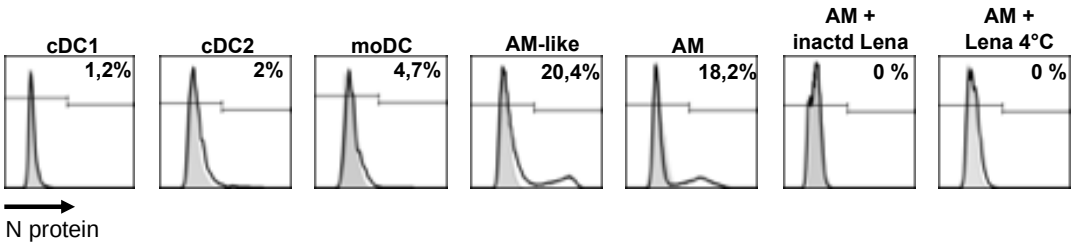



**Figure 7. cDC1 are activated upon *in vivo* Lena infection**

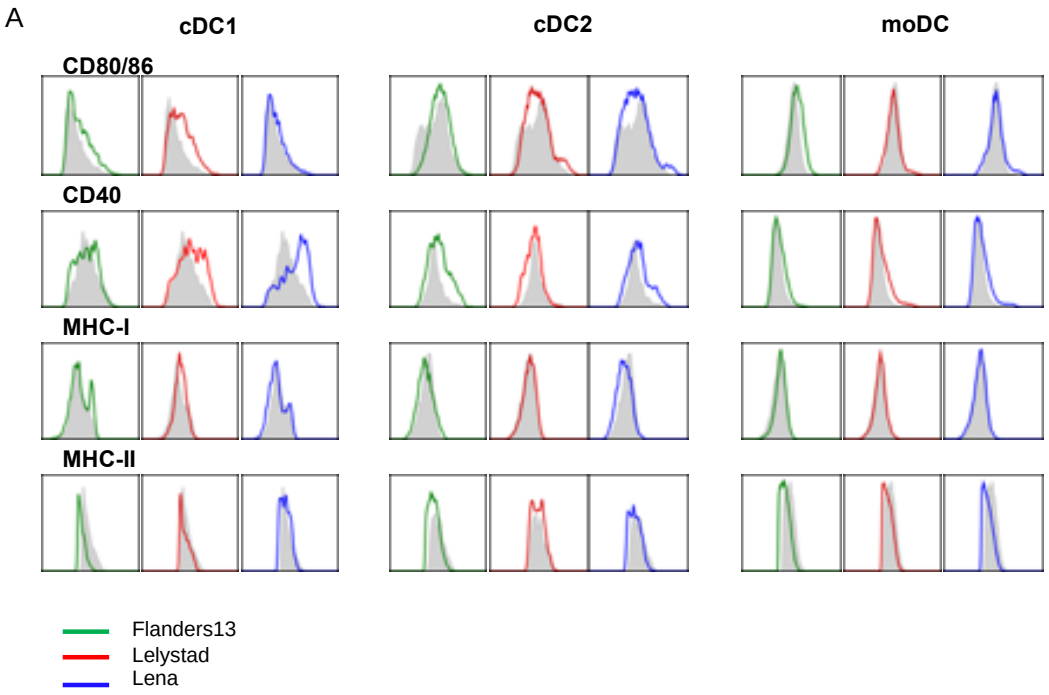
Principal Component Analysis (PCA) of DCs cytokines profile from PAR and BAL. The parameter values are cytokine mRNA expressions of sorted DCs from in vivo infected animals (Figure 6). Each pig is represented as a dot of specific color according to its group Mock (blue) or Lena (red). PCA multivariate analysis is a dimension-reduction tool that permit to reduce a large set of variables to a smaller one which still contains most of the information. The percentages indicated on the axis represents the variance between individuals explain by this axis. The PCA was done with 10 factors (each of one represent a cytokine). PCA graphics has been produced using FactoMineR R package (version 1.39) [30]. The ellipses depict the spread of the PCA data for mock or Lena infected conditions (blue and red respectively). Non-overlapping ellipses attest a significant difference in the global cytokine profile between mock and infected samples.

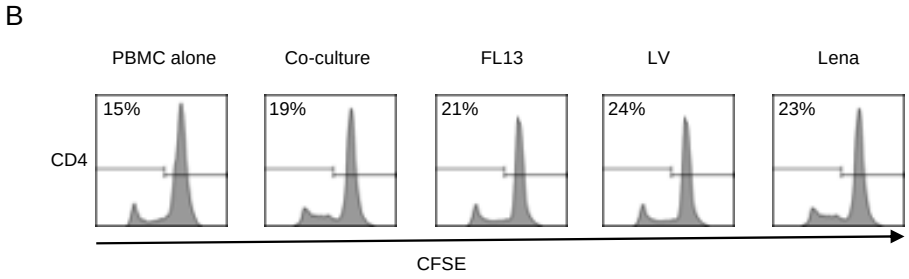



**Supplementary Figure S1. Cell sorting validation, BAL DCs analysis upon Lena *in vivo* infection.** **(A)** MNP isolation was validated by RT-qPCR. Messenger RNA expression of *XCR1*, *FcεRIα* and *MerTK* were analyzed on control (Grey dots, Mock) and infected (Black dots, Lena) populations. Results were normalized to the reference gene *RPS24* (ribosomal protein S24) expression. Arbitrary unit: A.U. represents $2^{-\Delta Ct}$. The RT-qPCR detection threshold is at the origin of the axis. Data are representative of 3 independent cell-sorting. **(B)** Percentage of MNP were monitored in mock (Grey circles) and infected (Blue circles) broncho-alveolar lavage (BAL) after immunostaining. Data are expressed as a percentage of MHC-II$^{high}$/CD11c$^{pos}$ cells (see Gate1 in **Figure 1**). The Mann -Whitney's test were performed. *P-values* *$<0.05$.
**(C)** Detection of viral transcripts on sorted MNP from BAL was assessed by RT-qPCR. Primers designed on viral Nucleocapsid protein (N) were used to detect viral transcript. The Mann-Whitney's test were performed. *P-values* *$<0.05$.




**Supplementary Figure S2.** ***Ex vivo*** **Lena infection of mononuclear phagocytes using flow cytometry.** Intracellular viral N protein was detected by flow cytometry in MNP-enriched parenchyma after 16 hours of Lena infection at MOI 0.5 (Open black histogram). As negative control, identical samples were incubated without virus (Closed grey histogram). Controls using inactivated (inactd) Lena and Lena incubated at 4°C with AM were performed.

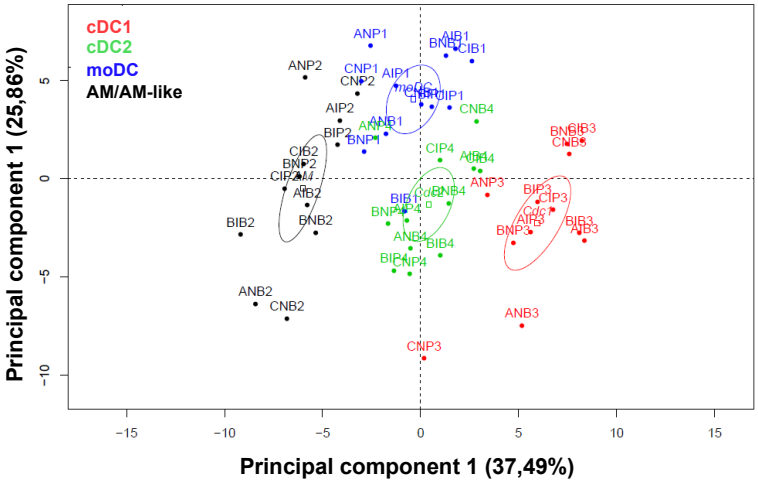



**Supplementary Figure S3. PRRSV infected mononuclear phagocytes presented no difference in maturation markers expressions or allogeneic T cells proliferation induction according to virus types.**

**(A)** Maturation markers expressions on cDC1, cDC2 and moDC relative to control (Closed grey histogram) after FL13 (Open green), LV (Open red) and Lena (Open blue) infection. Data are representative of 4 independant experiments.

**(B)** Percentage of proliferation of CFSE-stained $CD4^+$ after mixed lymphocytes reaction assay. Data are representative of 3 independant experiments.




Sample ID:
1st letter : cell-sorting ID
2nd letter : condition (I:infected/ N uninfected)
3rd letter : tissue (B: BAL/ P: PAR)
Digit :
1= moDC;2=AM/AM-LIKE;3=cDC1;4=cDC2

**Supplementary Figure S4.**

**(A)** Principal component analysis of cDC1, cDC2, moDC and AM/AM-like in BAL and PAR based on cytokine expression.

## *References*


1] J.H. Kuhn, M. Lauck, A.L. Bailey, A.M. Shchetinin, T.V. Vishnevskaya, Y. Bao, T.F. Ng, M. LeBreton, B.S. Schneider, A. Gillis, U. Tamoufe, D. Diffo Jle, J.M. Takuo, N.O. Kondov, L.L. Coffey, N.D. Wolfe, E. Delwart, A.N. Clawson, E. Postnikova, L. Bollinger, M.G. Lackemeyer, S.R. Radoshitzky, G. Palacios, J. Wada, Z.V. Shevtsova, P.B. Jahrling, B.A. Lapin, P.G. Deriabin, M. Dunowska, S.V. Alkhovsky, J. Rogers, T.C. Friedrich, D.H. O'Connor, and T.L. Goldberg, Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. Arch Virol 161 (2016) 755-68.

[2] T. Stadejek, A. Stankevicius, M.P. Murtaugh, and M.B. Oleksiewicz, Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play. Vet Microbiol 165 (2013) 21-8.

[3] R. Forsberg, T. Storgaard, H.S. Nielsen, M.B. Oleksiewicz, P. Cordioli, G. Sala, J. Hein, and A. Botner, The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe. Virology 299 (2002) 38-47.

[4] O. Garcia-Nicolas, A. Baumann, N.J. Vielle, J. Gomez-Laguna, J.J. Quereda, F.J. Pallares, G. Ramis, L. Carrasco, and A. Summerfield, Virulence and genotype-associated infectivity of interferon-treated macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. Virus Res 179 (2014) 204-11.

[5] S.B. Morgan, S.P. Graham, F.J. Salguero, P.J. Sanchez Cordon, H. Mokhtar, J.M. Rebel, E. Weesendorp, K.B. Bodman-Smith, F. Steinbach, and J.P. Frossard, Increased pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance. Vet Microbiol 163 (2013) 13-22.

[6] E. Weesendorp, S. Morgan, N. Stockhofe-Zurwieden, D.J. Popma-De Graaf, S.P. Graham, and J.M. Rebel, Comparative analysis of immune responses following experimental infection of pigs with European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of differing virulence. Vet Microbiol 163 (2013) 1-12.

[7] P. Renson, N. Rose, M. Le Dimna, S. Mahe, A. Keranflec'h, F. Paboeuf, C. Belloc, M.F. Le Potier, and O. Bourry, Dynamic changes in bronchoalveolar macrophages and cytokines during infection of pigs with a highly or low pathogenic genotype 1 PRRSV strain. Vet Res 48 (2017) 15.

[8] J.E. Butler, K.M. Lager, W. Golde, K.S. Faaberg, M. Sinkora, C. Loving, and Y.I. Zhang, Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. Immunol Res 59 (2014) 81-108.

[9] M.C. Rahe, and M.P. Murtaugh, Mechanisms of Adaptive Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Viruses 9 (2017).

[10] H. Mardassi, L. Wilson, S. Mounir, and S. Dea, Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. J Clin Microbiol 32 (1994) 2197-203.

[11] H. Van Gorp, W. Van Breedam, P.L. Delputte, and H.J. Nauwynck, Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol 89 (2008) 2943-53.

[12] E. Silva-Campa, L. Cordoba, L. Fraile, L. Flores-Mendoza, M. Montoya, and J. Hernandez, European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. Virology 396 (2010) 264-71.

[13] E. Weesendorp, N. Stockhofe-Zurwieden, D.J. Popma-De Graaf, H. Fijten, and J.M. Rebel, Phenotypic modulation and cytokine profiles of antigen presenting cells by European subtype 1 and 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in vitro and in vivo. Vet Microbiol 167 (2013) 638-50.

[14] H. Singleton, S.P. Graham, K.B. Bodman-Smith, J.P. Frossard, and F. Steinbach, Establishing Porcine Monocyte-Derived Macrophage and Dendritic Cell Systems for Studying the Interaction with PRRSV-1. Front Microbiol 7 (2016) 832.
[15] I.S. Frydas, M. Verbeeck, J. Cao, and H.J. Nauwynck, Replication characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) European subtype 1 (Lelystad) and subtype 3 (Lena) strains in nasal mucosa and cells of the monocytic lineage: indications for the use of new receptors of PRRSV (Lena). Vet Res 44 (2013) 73.
[16] R. van Furth, Z.A. Cohn, J.G. Hirsch, J.H. Humphrey, W.G. Spector, and H.L. Langevoort, The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. Bull World Health Organ 46 (1972) 845-52.
[17] M.J. Proll, C. Neuhoff, K. Schellander, M.J. Uddin, M.U. Cinar, S. Sahadevan, X. Qu, M.A. Islam, M. Poirier, M.A. Muller, C. Drosten, D. Tesfaye, E. Tholen, and C. Grosse-Brinkhaus, Transcriptome profile of lung dendritic cells after in vitro porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. PLoS One 12 (2017) e0187735.
[18] C.L. Loving, S.L. Brockmeier, and R.E. Sacco, Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. Immunology 120 (2007) 217-29.
[19] M. Guilliams, F. Ginhoux, C. Jakubzick, S.H. Naik, N. Onai, B.U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, and S. Yona, Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. Nat Rev Immunol 14 (2014) 571-8.
[20] M. Guilliams, and L. van de Laar, A Hitchhiker's Guide to Myeloid Cell Subsets: Practical Implementation of a Novel Mononuclear Phagocyte Classification System. Front Immunol 6 (2015) 406.
[21] P. Maisonnasse, E. Bouguyon, G. Piton, A. Ezquerra, C. Urien, C. Deloizy, M. Bourge, J.J. Leplat, G. Simon, C. Chevalier, S. Vincent-Naulleau, E. Crisci, M. Montoya, I. Schwartz-Cornil, and N. Bertho, The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. Mucosal Immunol 9 (2016) 835-49.
[22] U.U. Karniychuk, M. Geldhof, M. Vanhee, J. Van Doorsselaere, T.A. Saveleva, and H.J. Nauwynck, Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. BMC Vet Res 6 (2010) 30.
[23] G. Wensvoort, C. Terpstra, J.M. Pol, E.A. ter Laak, M. Bloemraad, E.P. de Kluyver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar, and et al., Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet Q 13 (1991) 121-30.
[24] P. Renson, C. Fablet, M. Le Dimna, S. Mahe, F. Touzain, Y. Blanchard, F. Paboeuf, N. Rose, and O. Bourry, Preparation for emergence of an Eastern European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strain in Western Europe: Immunization with modified live virus vaccines or a field strain confers partial protection. Vet Microbiol 204 (2017) 133-140.
[25] F. Marquet, M. Bonneau, F. Pascale, C. Urien, C. Kang, I. Schwartz-Cornil, and N. Bertho, Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. PLoS One 6 (2011) e16320.
[26] P. Maisonnasse, E. Bordet, E. Bouguyon, and N. Bertho, Broncho Alveolar Dendritic Cells and Macrophages Are Highly Similar to Their Interstitial Counterparts. PLoS One 11 (2016) e0167315.
[27] F. Marquet, T.P. Vu Manh, P. Maisonnasse, J. Elhmouzi-Younes, C. Urien, E. Bouguyon, L. Jouneau, M. Bourge, G. Simon, A. Ezquerra, J. Lecardonnel, M. Bonneau, M. Dalod, I. Schwartz-Cornil, and N. Bertho, Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. J Immunol 193 (2014) 5883-93.

[28] M.P. Murtaugh, C.R. Johnson, Z. Xiao, R.W. Scamurra, and Y. Zhou, Species specialization in cytokine biology: is interleukin-4 central to the T(H)1-T(H)2 paradigm in swine? Dev Comp Immunol 33 (2009) 344-52.
[29] S.J. Lê, J.; Husson, F., FactoMineR: an R package for multivariate analysis. Journal of statistical software 25 (2008) 1-18.
[30] C. Deloizy, E. Bouguyon, E. Fossum, P. Sebo, R. Osicka, A. Bole, M. Pierres, S. Biacchesi, M. Dalod, B. Bogen, N. Bertho, and I. Schwartz-Cornil, Expanding the tools for identifying mononuclear phagocyte subsets in swine: Reagents to porcine CD11c and XCR1. Dev Comp Immunol 65 (2016) 31-40.
[31] G. Auray, I. Keller, S. Python, M. Gerber, R. Bruggmann, N. Ruggli, and A. Summerfield, Characterization and Transcriptomic Analysis of Porcine Blood Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells Reveals Striking Species-Specific Differences. J Immunol 197 (2016) 4791-4806.
[32] E. Bordet, P. Maisonnasse, P. Renson, E. Bouguyon, E. Crisci, M. Tiret, D. Descamps, C. Bernelin-Cottet, C. Urien, F. Lefevre, L. Jouneau, O. Bourry, J.J. Leplat, I. Schwartz-Cornil, and N. Bertho, Porcine Alveolar Macrophage-like cells are pro-inflammatory Pulmonary Intravascular Macrophages that produce large titers of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Sci Rep 8 (2018) 10172.
[33] X. Duan, H.J. Nauwynck, and M.B. Pensaert, Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Vet Microbiol 56 (1997) 9-19.
[34] H. Hammad, M. Plantinga, K. Deswarte, P. Pouliot, M.A. Willart, M. Kool, F. Muskens, and B.N. Lambrecht, Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. J Exp Med 207 (2010) 2097-111.
[35] C. Langlet, S. Tamoutounour, S. Henri, H. Luche, L. Ardouin, C. Gregoire, B. Malissen, and M. Guilliams, CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. J Immunol 188 (2012) 1751-60.
[36] M. Plantinga, M. Guilliams, M. Vanheerswynghels, K. Deswarte, F. Branco-Madeira, W. Toussaint, L. Vanhoutte, K. Neyt, N. Killeen, B. Malissen, H. Hammad, and B.N. Lambrecht, Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. Immunity 38 (2013) 322-35.
[37] C. Cheong, I. Matos, J.H. Choi, D.B. Dandamudi, E. Shrestha, M.P. Longhi, K.L. Jeffrey, R.M. Anthony, C. Kluger, G. Nchinda, H. Koh, A. Rodriguez, J. Idoyaga, M. Pack, K. Velinzon, C.G. Park, and R.M. Steinman, Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. Cell 143 (2010) 416-29.
[38] E. Segura, M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiocchia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, and S. Amigorena, Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. Immunity 38 (2013) 336-48.
[39] L. Wang, H. Zhang, X. Suo, S. Zheng, and W.H. Feng, Increase of CD163 but not sialoadhesin on cultured peripheral blood monocytes is coordinated with enhanced susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Vet Immunol Immunopathol 141 (2011) 209-20.
[40] H. Singleton, S.P. Graham, J.P. Frossard, K.B. Bodman-Smith, and F. Steinbach, Infection of monocytes with European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) strain Lena is significantly enhanced by dexamethasone and IL-10. Virology (2018).

[41] A. Baumann, E. Mateu, M.P. Murtaugh, and A. Summerfield, Impact of genotype 1 and 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses on interferon-alpha responses by plasmacytoid dendritic cells. Vet Res 44 (2013) 33.
[42] J. Xie, I. Christiaens, B. Yang, W.V. Breedam, T. Cui, and H.J. Nauwynck, Molecular cloning of porcine Siglec-3, Siglec-5 and Siglec-10, and identification of Siglec-10 as an alternative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). J Gen Virol 98 (2017) 2030-2042.
[43] Z. Escalona, B. Alvarez, H. Uenishi, D. Toki, M. Yuste, C. Revilla, M.G. del Moral, F. Alonso, A. Ezquerra, and J. Dominguez, Molecular characterization of porcine Siglec-10 and analysis of its expression in blood and tissues. Dev Comp Immunol 48 (2015) 116-23.
[44] R.S. Prather, R.R. Rowland, C. Ewen, B. Trible, M. Kerrigan, B. Bawa, J.M. Teson, J. Mao, K. Lee, M.S. Samuel, K.M. Whitworth, C.N. Murphy, T. Egen, and J.A. Green, An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Virol 87 (2013) 9538-46.
[45] K.M. Whitworth, R.R. Rowland, C.L. Ewen, B.R. Trible, M.A. Kerrigan, A.G. Cino-Ozuna, M.S. Samuel, J.E. Lightner, D.G. McLaren, A.J. Mileham, K.D. Wells, and R.S. Prather, Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Nat Biotechnol 34 (2016) 20-2.
[46] K. Furuhashi, T. Suda, H. Hasegawa, Y. Suzuki, D. Hashimoto, N. Enomoto, T. Fujisawa, Y. Nakamura, N. Inui, K. Shibata, H. Nakamura, and K. Chida, Mouse lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T-cell responses. Am J Respir Cell Mol Biol 46 (2012) 165-72.
[47] T.S. Kim, and T.J. Braciale, Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. PLoS One 4 (2009) e4204.
[48] J. Helft, B. Manicassamy, P. Guermonprez, D. Hashimoto, A. Silvin, J. Agudo, B.D. Brown, M. Schmolke, J.C. Miller, M. Leboeuf, K.M. Murphy, A. Garcia-Sastre, and M. Merad, Cross-presenting CD103+ dendritic cells are protected from influenza virus infection. J Clin Invest 122 (2012) 4037-47.
[49] A. Silvin, C.I. Yu, X. Lahaye, F. Imperatore, J.B. Brault, S. Cardinaud, C. Becker, W.H. Kwan, C. Conrad, M. Maurin, C. Goudot, S. Marques-Ladeira, Y. Wang, V. Pascual, E. Anguiano, R.A. Albrecht, M. Iannacone, A. Garcia-Sastre, B. Goud, M. Dalod, A. Moris, M. Merad, A.K. Palucka, and N. Manel, Constitutive resistance to viral infection in human CD141(+) dendritic cells. Sci Immunol 2 (2017).
[50] A.N. Desch, G.J. Randolph, K. Murphy, E.L. Gautier, R.M. Kedl, M.H. Lahoud, I. Caminschi, K. Shortman, P.M. Henson, and C.V. Jakubzick, CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. J Exp Med 208 (2011) 1789-97.
[51] F. Heil, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer, Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science 303 (2004) 1526-9.
[52] H. Kono, and K.L. Rock, How dying cells alert the immune system to danger. Nat Rev Immunol 8 (2008) 279-89.
[53] O. Garcia-Nicolas, G. Auray, C.A. Sautter, J.C. Rappe, K.C. McCullough, N. Ruggli, and A. Summerfield, Sensing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Infected Macrophages by Plasmacytoid Dendritic Cells. Front Microbiol 7 (2016) 771.

*Résultats supplémentaires : Identification de nouvelles cellules infectées*

Dans les approches présentées précédemment, nous nous étions focalisés sur l'infection de 5 sous-types cellulaires déjà identifiés. Nous avons donc réalisé des tris cellulaires puis des infections *in vitro*. Grâce aux modèles d'infection *in vitro* de parenchyme enrichi en DC et macrophages, il a été possible de rechercher les cellules infectées sans a priori sur leur profil (Figure 1). Ces expériences de cytométrie en flux ont permis d'identifier de nouvelles cellules infectées *in vitro* par la souche Lena. Le profil de ces cellules est CMH-II$^{low}$/CD11c$^{high}$/CD163$^{+}$ (Figure 1) et elles se trouvent à la fois dans le lavage broncho-alvéolaire (BAL) et le tissu pulmonaire (parenchyme, PAR).

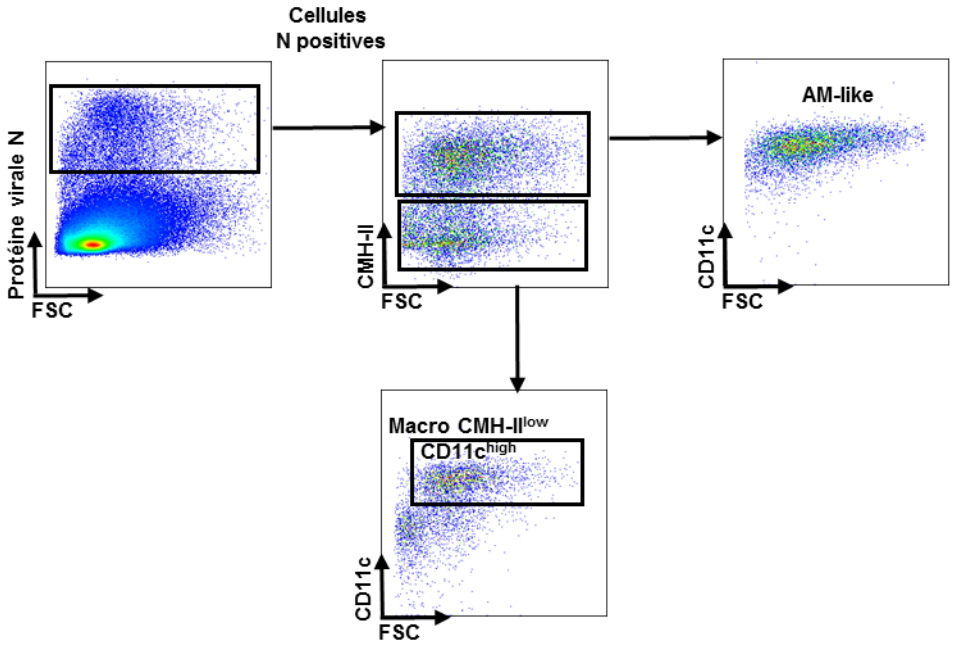



Figure 1. Détection au FACS de cellules du parenchyme pulmonaire infectées *in vitro* par la souche Lena

*Après immuno-marquage, les cellules du parenchyme pulmonaire infectées par le SDRPv sont séléctionnées. Les cellules CMH-II positives correspondent aux AM-like. Les cellules CMH-II$^{+}$/CD11c$^{+}$ constituent une nouvelle population.*

La coloration May-Grünwald Giemsa (MGG) de ces cellules triées a révélé des caractéristiques macrophagiques telles qu'un cytoplasme important et riche en vacuole (Figure 2) ainsi qu'une taille variable entre 20 et 30 µm. Au vu de ce résultat, nous nommerons ces cellules Mϕ CMH-II$^{low}$, tout en gardant à l'esprit que des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour valider cette origine.

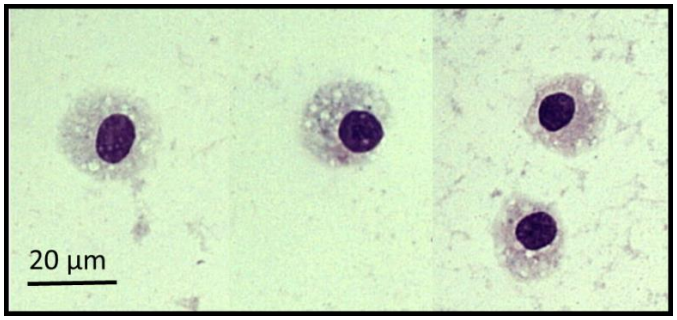



Figure 2. Coloration MGG des cellules après tri cellulaire

Afin de valider l'infection de ces cellules par le SDRPv, des tris cellulaires et des infections *in vitro* ont été réalisés. Le virus a ensuite été détecté dans les cellules par RT-qPCR et dans le surnageant par titration grâce à la méthode des TCID50/mL (Figure 3). Ces expériences révèlent que les macrophages CMH-II$^{low}$ sont susceptibles d'être infectés par la souche Lena et de produire des virions infectieux dans le surnageant. De futures études devront investiguer l'origine de ces cellules et leur rôle lors d'infection par le SDRPv.

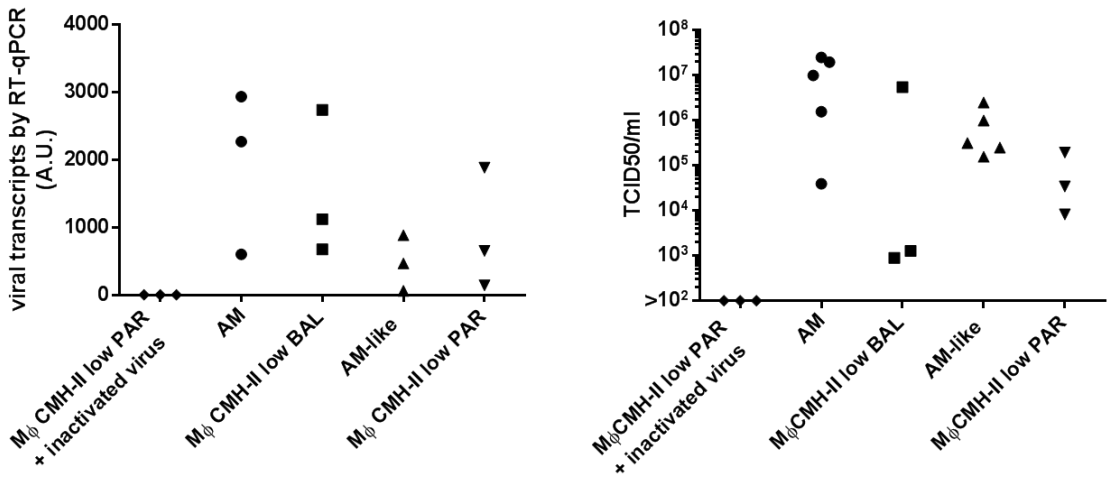



Figure 3. Infection des macrophages CMH-II$^{low}$ du BAL et du PAR. Après infection des cellules avec la souche Lena (MOI $10^{-3}$, 24 heures d'infection). La réplication virale a été évaluée par RT-qPCR et titration du surnageant de culture des cellules.

### *Résultats supplémentaires : Transfert cellulaire in vivo*

En utilisant des études *in vitro* et *in vivo*, nous avons découvert une différence dans la polarisation des réponses T *helper* induites entre les souches de type 1.1 et de type 1.3. Afin d'identifier si cette polarisation de type Th1 avec la souche Lena peut être protectrice face au

SDRPv, nous avons réalisé une expérience de transfert de lymphocytes *in vivo* entre des porcs histocompatibles. Chez le porc, le marqueur CD6 permet d'avoir accès à des lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$. Nous avons choisi de transférer des lymphocytes $CD6^+$ de la rate et du poumon d'un porc donneur préalablement infecté par la souche Lena type 1.3.

Le schéma d'expérience correspondait à infecter un porc donneur avec $10^5$ $TCID_{50}$ de la souche Lena puis de le réinfecter avec $10^6$ $TCID_{50}$ afin d'obtenir un animal hyper-immun. Après 22 jours, les lymphocytes T $CD6^+$ de la rate et du poumon ont été collectés par sélection positive sur colonne magnétique (MACS®, Miltenyi Biotech, Germany) puis transférées à 4 porcs receveurs. Un groupe contrôle composé de 5 porcs non transférés a été formé. Un exemple d'enrichissement des lymphocytes T du poumon est présenté dans la figure suivante (Figure 1). La qualité de l'enrichissement a été validée par cytométrie en flux en utilisant les marqueurs CD3, CD4 et CD8β. La déplétion des lymphocytes B a été suivie par marquage CD79α (données non fournies). Pour exemple, dans le poumon, la proportion de lymphocytes B passe de 3,57% à 0,26% après déplétion. L'absence de virus dans les cellules transférées a été vérifiée par RT-qPCR (données non fournies).

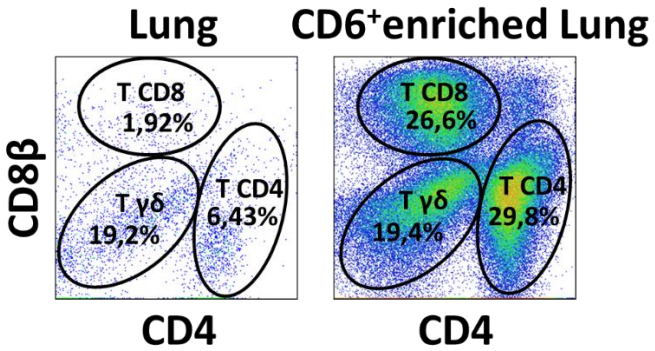



Figure 1. Enrichissement des lymphocytes T du poumon par sélection positive

La fonctionnalité des lymphocytes triés a été testée par stimulation de ces cellules pendant 24 heures avec 5µg/ml d'un peptide viral *RNA-dependant RNA polymerase* (RdRp) (Mimotopes, UK). La production d'IFNγ par les lymphocytes après stimulation a été suivi par marquage intracellulaire (Figure 2). Un contrôle positif a été réalisé avec une stimulation chimique correspondant à 500 ng/ml ionomycine and 5ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich).

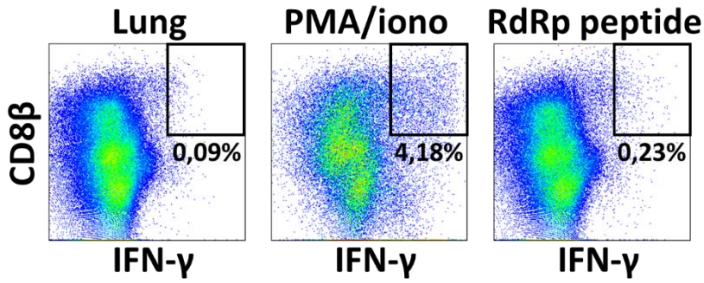



Figure 2. Fonctionnalité des lymphocytes T CD6+ transférés

Après collecte et purification des lymphocytes du porc donneur, les porcs du groupe transféré ont reçu $10^8$ lymphocytes T $CD6^+$ par injection intra-veineuse. Ces porcs et ceux du groupe contrôle ont ensuite été infectés par voie intra-nasale avec $10^5$ $TCID_{50}$ de la souche Lena. Les porcs contrôles ont été infectés sans recevoir de transfert. Il avait été prévu que les porcs contrôles reçoivent la même quantité de PBMC que le nombre de lymphocytes transférés aux porcs du groupe transféré. Malheureusement, des impératifs techniques ont empêché un tel transfert.

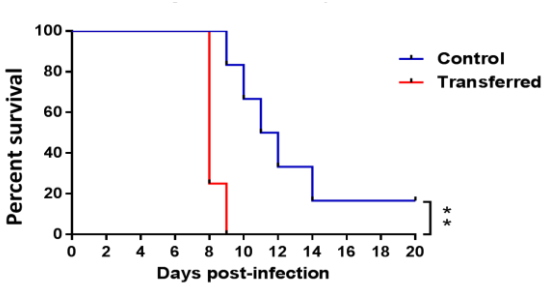



Figure 3. Courbe de survie des porcs transférés et des porcs contrôles
Statistique test du *Log-rang* basé sur la méthode de Kaplan-Meier

Les courbes de survie entre les animaux des deux groupes ont ensuite été comparées. Le transfert des lymphocytes T $CD6^+$ impacte négativement la cinétique de survie des porcs après l'infection par la souche Lena. La réponse anticorps fut suivie par ELISA et aucune différence significative ne fut observée entre les deux groupes. L'analyse de la virémie 9 jours après infection, n'a pas révélé de différences significatives entre le groupe contrôle et le groupe transféré. Le dosage des cytokines présentes dans le sérum a révélé que la concentration en IFNα, IL-12, IL-10, IL-2 et IFNγ avaient tendance à être plus forte chez les porcs transférés que chez les porcs contrôles. Néanmoins, ce résultat n'est qu'une tendance et aucune différence significative n'a été observée.

Il faut noter que lors de la mise en place du plan d'expérience, il avait été décidé que les porcs contrôles recevraient un transfert de PBMC naïfs afin d'évaluer l'effet du transfert non-

spécifique. Malheureusement, pour des raisons techniques les porcs n'ont pas pu recevoir de transfert de PBMC. Il est donc difficile de conclure sans exclure un potentiel rôle du transfert dans la création d'une inflammation supplémentaire potentiellement responsable de la différence de survie observée entre les 2 groupes. Parmi les limites de ce résultat, il faut aussi noter que chez le porc, l'isolement de population cellulaire sur colonne est complexe et qu'il est impossible d'obtenir 100% de pureté. La fraction transférée contenait donc probablement des lymphocytes T reg et des T γδ qui ont pu jouer un rôle dans le résultat obtenu.

### *Discussions complémentaires*

Nos résultats montrent que les DC ne sont pas susceptibles à l'infection par les 3 souches européennes étudiées. Dans cet article, la question de la limite de détection du SDRPv par la méthode de RT-qPCR se pose à nouveau. L'utilisation d'anticorps dirigés contre des protéines virales permet de compléter cette approche. Dans cette publication, l'anticorps dirigé contre la protéine de la nucléocapside N a été utilisé. Afin d'éviter tout doute sur une détection de virions phagocytés, il serait préférable d'utiliser un anticorps dirigé contre une protéine non-structurale. Des anticorps anti-NSP7 ont été testés sans succès.

La découverte et l'identification des facteurs de polarisation de la réponse T *helper* sont relativement récents chez le porc. Face à la complexité des marquages intracellulaires chez le porc, nous avons décidé d'étudier ces réponses par RT-qPCR. Chez le porc, il existe des spécificités à prendre en compte dans les comparaisons avec les autres espèces. Ainsi, alors que dans les modèles murins et humains, la cytokine IL-4 est associée à une réponse Th2, le rôle de l'IL-4 chez le porc semble beaucoup moins clair. Cette cytokine n'est pas un facteur de stimulation des lymphocytes B et est capable de supprimer la prolifération des lymphocytes B spécifiques de l'antigène (Murtaugh et al., 2009), d'où notre utilisation de l'IL-13 pour caractériser les réponses Th2 chez le porc.

La souche Lena de type 1.3 s'est distinguée des autres souches par sa capacité à polariser la réponse T *helper* vers une réponse Th1. L'étude du profil cytokinique des DC de porcs infectés *in vivo* a révélé que les cDC1 ont tendance à exprimer plus d'IFNα, TNFα, IL-12p40 et IL-8 dans un contexte infectieux. Ce résultat appuie l'hypothèse d'une activation de ces cellules par la souche Lena. Il faut noter qu'il est impossible de conclure sur des différences statistiques, le nombre d'individu étant insuffisant pour réaliser de tels tests. Le nombre d'individus étant malheureusement soumis à des contraintes techniques et économiques. Il

aurait été intéressant de pouvoir réaliser des études *in vivo* identiques avec les souches LV et FL13 afin de savoir si ce résultat est bien dépendant de la souche utilisée.

Dans les travaux précédents de mon équipe, les cDC1 du poumon ont été montrées comme les principales inductrices de la réponse Th1. Nous avons tenté de mettre en place des expériences de MLR avec des cDC1 isolées après infection *in vitro*. Malheureusement, le nombre de cDC1 isolé par individu est trop faible pour concrétiser une telle expérience. Il semble probable que lors de l'infection Lena ce soit les cDC1 qui activent la forte réponse Th1 observée. Néanmoins, des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de valider ou d'invalider une telle hypothèse.

## Papier n°4 : Identification et interaction des macrophages et des lymphocytes B dans le ganglion de porc à l'état basal et lors d'une infection par le SDRPv

### *Introduction des travaux*

Le ganglion est un organe clé dans l'induction de la réponse immunitaire. Chez le porc, son organisation est inversée par rapport à la plupart des mammifères. En effet, la lymphe se déverse au centre du ganglion et percole jusqu'à sa périphérie. Le phénotype et la localisation des cellules immunitaires composant cet organe ont été peu décrits.

Dans le cas d'une infection SDRPv, il a été démontré que le virus persiste dans le ganglion durant plusieurs semaines et l'identité exacte des cellules infectées dans cet organe n'a pas encore été révélée. De plus, le retard d'apparition des anticorps neutralisants dirigés contre ce virus suggère une interférence du SDRPv avec les phénomènes de différenciation et de sélection des lymphocytes B ayant lieu dans les follicules B des ganglions.

Dans nos travaux précédents, nous avons montré que les DC du poumon n'étaient pas infectées par le SDRPv de type 1. Dans cette publication, nous avons décidé de nous focaliser sur les macrophages (MΦ) et les lymphocytes B (LB) des ganglions trachéo-bronchiques afin d'étudier leur localisation, ainsi que la susceptibilité des MΦ à l'infection par le SDRPv de type 1.

Pour résumer ces travaux, nous avons identifié en microscopie 3 populations de macrophages grâce à leur expression des récepteurs CD163 et CD169. Il s'agit de macrophages périfolliculaires (PFMΦ), de macrophages associés aux cordons lymphatiques (CordMΦ) et des macrophages situés à proximité des vaisseaux lymphatiques efférents (effMΦ). Après des études en cytométrie en flux, ces macrophages se sont avérés équivalents respectivement aux *subcapsular sinus* MΦ (SCSMΦ), aux *medullary cord* MΦ (MCMΦ) et aux *medullary sinus* MΦ (MSMΦ) connus chez la souris. Nous avons aussi identifié 5 stades de différenciation des lymphocytes B dont une population CD169 positive dénommée *CD169$^{pos}$ B cell*. Notre étude révèle que les effMΦ et les PFMΦ sont infectées par le SDRPv de type 1 *in vivo*. L'étude de l'expression de facteur de transcription dans les LB a révélé une expression plus forte du gène *BCL-6* dans les cellules *CD169$^{pos}$ B cell* lors d'une infection.

Cet article devrait être soumis en octobre 2018 après l'ajout d'expériences supplémentaires.

*Article en cours de rédaction*

# Identification, localization and interaction of macrophages and B cells in the inverted porcine lymph node at steady state and upon Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection.

Bordet E[1], Crisci E[1], Bouguyon E[1], Ranson P[2], Rault S[1], Pezant J[3], Boulesteix O[3], Pleau A[3], Larcher T[4], Barc C[3], Bourge M[5], Bourry O[3], Schwartz-Cornil I[1], Bertho N[1*]

[1]VIM-INRA-Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas, France

[2]Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzane, Unité Virologie et Immunologie Porcines, Zoopôle, BP53, 22440 Ploufragan, France.

[3]INRA, UE1277, Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale, PFIE, Nouzilly, France

[4]INRA, UMR 703 APEX, Oniris, Nantes, France.

[5]I2BC, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette, France.

*Abstract*

Swine lymph nodes (LN) presented an inverted structure compared to mouse and human ones. In pig, the lymph diffuses from the center of the LN to the periphery suggesting that location, organization and function of macrophages could be very different from other models. The porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) is a major swine pathogen that mainly infects macrophages (MΦ). PRRSV is a persistent virus that could be detected in the LN up to five months post-infection. This persistence is concomitant with a delayed in neutralizing antibodies appearance but nothing is known neither on the identity of the infected LN cells, nor on the effect of PRRSV on the follicular B cell final maturation. Herein, we identified 3 different macrophage populations of the porcine tracheobronchial LN and called them perifollicular macrophages (PFMΦ), cord macrophages (CordMΦ) and efferent MΦ (effMΦ) corresponding to murine subcapsular sinus MΦ (SCSMΦ), medullary cord MΦ (MCMΦ) and medullary sinus MΦ (MSMΦ) respectively. We then explored the B cell follicles differentiation stages, at steady state and upon PRRSV infection. Our study reveals an infection of PFMΦ by PRRSV. Regarding B cell maturation, an up-regulation of BCL-6 gene in a $CD169^{pos}$ B cell population related to centroblasts was detected upon infection. BCL-6 is a master gene regulating the formation of germinal center and final maturation of follicular B cells. Overexpression of this gene in immature B cells might be an interesting mechanism explaining the delay in neutralizing antibodies establishment in PRRSV infection.

## *Introduction*

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a pathology induced by the PRRS virus (PRRSV), a positive single stranded RNA virus from the *Arterivirade* family within the *Nidovirales* order [1]. Two PRRSV genotypes have been identified: the genotype 1 from an European origin and genotype 2 from an American origin. These genotypes share only 50-60% sequence identity [2]. Genotype 1 have been divided into four subtypes. Genotype 1 subtype 1 (Type 1.1) is the most frequent subtype in Europe. Among Type 1.1, a newly described variant has been identified in Belgium and called Flanders13 [3]. Type 1.3 such as Lena strain are present in Eastern Europe and are more pathogenic than Type 1.1 [4]. PRRSV strongly impact the swine industry due to reproductive failures, delay in weight gain and super-infections facilitation [5]. After oronasal transmission, PRRSV colonizes the respiratory tract and could play an immunomodulatory role that delays and weakens host responses, leading to virus persistence. During persistence phase, virus is no longer detected in lung but could be isolated from lymph nodes (LN) up to five months post infection [6]. Although anti-PRRSV antibodies are detected in the serum one week post-infection, the neutralizing antibodies emergence is strongly delayed sometimes for more than one month (for review see [7]). This delay has been proposed to be the main reason for PRRSV escape to the immune response [7]. Interestingly, it has been observed in germ free piglets that PRRSV Type 2 infection triggers a non-antigen selective expansion of B cells in bone marrow in all immunoglobulin classes, suggestive of a PRRSV-induced defect in the B cells maturation process [8]. PRRSV binding and internalization are mediated through interactions between viral structural proteins and cellular receptors. Two principal cellular receptors have been identified: CD169/Sialoadhesin allows the binding of the virus to the cells while CD163 is essential for the release of the genome from the early endosome to the cytosol (for review see [10]). PRRSV main cellular targets are cells from the monocytic lineage, among them so far, only alveolar macrophages (MΦ) and pulmonary intravascular MΦ [11] have been shown to be actually infected *in vivo*. Virus can be detected in secondary lymphoid tissues such as tonsils and lymph nodes [3;12;13] but its target(s) have not been precisely identified in these tissues. One team studied the porcine LN MΦ for the sake of vaccine targeting to CD163 or CD169 [14;15;16] but without making a distinction between different MΦ subpopulations.

In mouse, at least 3 populations of LN MΦ have been identified (for review [17]). The

peripheral antigens arrived through afferent lymph to the LN subcapsular space. There, the subcapsular sinus MΦ (SCS MΦ, $CD169^{pos}/F4/80^{neg}$) shuttle the antigens into the B cell follicle. SCS MΦ have been demonstrated as mandatory for the mounting of efficient cytotoxic [18] and humoral immune [19] responses. The medullary cord MΦ (MCM, $CD169^{neg}/F4/80^{pos}$) have a role in the plasma cells terminal maturation [20] and medullary sinus MΦ (MSM, $CD169^{pos}/F4/80^{neg}$), situated at the exit of the LN would be involved in the final clearance of lymph born particles.

In most species, free antigens and DC migrating from the peripheral tissues enter the LN through the afferent lymphatic vessels into the external capsular sinus. Free or antibody bound antigens are taken in charge by the SCS MΦ that transfer them from the sinus to the B cell follicle. Naïve lymphocytes enter the LN from the blood through the high endothelial venules (HEV) and then patrol the B and T cell areas. Upon antigen encounter in the context of the adequate APC/antigen complexes, T and B lymphocytes get activated, mature and exit the LN through the medullary sinus and the efferent lymphatic vessel. Thus most mammals, including mice and humans, possess LN with a centripetal lymphatic motion, afferent lymph enters the LN through the peripheral capsule and finds its way out toward the LN central hilum and the efferent lymph. Conversely, in pigs [21], like in several species belonging to the laurasiatheria superorder such as dolphins [22], rhinoceros [23] but also in elephants from the afroteria superorder [24], lymph presents a centrifuged motion. Afferent lymph entered the LN from the central hilum and then percolates the LN parenchyma toward the peripheral capsule and the efferent lymph (for review see [25]).

The porcine afferent lymphatic vessels enter the capsule at one or more sites and penetrate deep into the area occupied by the B follicles and the T cell area. Then they join the trabecular sinuses and filters into the peripheral sinuses which converge and form several efferent vessels at the periphery of the node [26]. Naïve lymphocytes entered the LN through HEV as in other mammalian species, however, after having scanned the B and T cell areas, they exit directly in the blood through the efferent blood vessels.

A study on the porcine respiratory tract draining LN upon PRRSV infection has been recently published [13]. Using different Type 1 PRRSV strains and microdissection of follicular and interfollicular areas, the authors detected similar viral load in both regions. Moreover, they observed a $CD79\alpha^{pos}$ B cell decrease and a T cell increase in the follicles as well as IFNα and

TNFα down regulations in both LN areas. The PRRSV capacity to replicate in the respiratory draining LN for more than a month [3;13], paralleled with the delayed neutralizing antibodies appearance suggest that LN-MΦ infection by PRRSV might directly influence the B cell maturation process.

To understand the impact of PRRSV infection on the LN myeloid APC, and to find clues on the mechanisms used by PRRSV to down-modulate and delay the acquired immune responses, we first described the localization and phenotype of the different MΦ subpopulations of the pig respiratory LN. Thanks to their phenotype and localization we could assign to each of them their likely mouse counterpart. We described the different B cell activation/differentiation stages according to their expression of key transcription factors of B cell differentiation and their follicular localization. Subsequently, *in vivo* PRRSV infections were performed in order to study susceptibility to infection of previously identified cells and impact of PRRSV infection on B cell differentiation mechanisms.

## *Methods*

### *Cell isolation and infection*

Tracheobronchial lymph nodes were collected from Large White conventionally bred sows obtained from *Guy Harang* slaughterhouse (Houdan, France). Tissues were minced and incubated with RPMI 1640 medium supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 10% inactivated fetal calf serum (FCS, Invitrogen, Paisley, UK). Digestion were performed for 30 min at 37°C by adding 2 mg/ml collagenase D (Roche, Meylan, France), 1 mg/ml dispase (Invitrogen) and 0.1 mg/ml DNase I (Roche). Filtration on 40 µm cell strainers were performed and red blood cells were lysed using erythrolysis buffer (10 mM $NaHCO_3$, 155 mM $NH_4Cl$, and 10 mM EDTA). Cells were washed in PBS/EDTA and frozen in FCS + 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

For *in vivo* experiments, PRRSV infections were performed at INRA PFIE (Nouzilly, France) for Flanders 13 (FL13) infection and ANSES (Ploufragan, France) for Lena infections. For FL13 infections the animal experiment was authorized by the French Ministry for Research (authorization no.APAFIS#413-2015051418327338) and approved by the national ethics committee (authorization no. 09/07/13-1). Six pigs (free from PRRSV) were housed in biosecurity level-2 air-filtered animal facilities. At 10 weeks of age, pigs were inoculated

intranasally with PRRSV FL13 strain (genotype 1.1, $5.10^5$ TCID50/animal). Five days post infection (dpi), animals were euthanatized and tracheobronchial LN were collected and processed as described above.

For Lena infection, the animal experiment was authorized by the French Ministry for Research (authorization no. 00676.01) and approved by the national ethics committee (authorization no. 09/07/13-1). Eight Large White piglets coming from a nucleus herd (free from PRRSV, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae)* were housed in biosecurity level-3 air-filtered animal facilities. At 10 weeks of age, 4 pigs were inoculated intranasally with PRRSV Lena strain (genotype 1.3, $5.10^5$ TCID50/animal). Ten days post infection (dpi), animals from control and infected groups were euthanatized and tracheobronchial LN were collected and processed as described above.

### *Immunohistochemical staining*

Tracheobronchial LN were frozen in Tissue Teck (Sakura, Paris, France) and conserved at –80°C. Sections of 14 µm were obtained using a cryostat (Leica CM3050S, Nanterre, France) and deposed on Superfrost® glass slides (ThermoFisher scientific). Cryosections were fixed in methanol/acetone (1:1) at -20°C for 20 min. Fixed slides were saturated using PBS supplemented with 5% horse serum (HS) and 5% swine serum (SS) for 30 min at room temperature (RT). When biotinylated antibodies were used, a specific step of endogenous biotins saturation using Avidin/Biotin Blocking Kit (Invitrogen) was added. Primary and secondary antibodies (Table 1) were added at 4°C overnight or 30 min, respectively. Slides were analyzed using Zeiss AXIO Observer.Z1 microscope and Zen 2012 Software (Zeiss, Jena, Germany).

### *Flow cytometry analysis*

Cells were stained in blocking solution, composed of PBS-EDTA supplemented with 5%HS and 5% SS. Antibodies were added to the blocking solution for 30 min on ice and then washed in PBS-EDTA with 2% FCS. Staining were made in 4 steps, including PBS/EDTA (2 mM) washing between each step; first the uncoupled primary antibodies of different species/isotypes, second the secondary species/isotype specific fluorochrome-coupled antibodies, third the fluorochrome-coupled or biotinylated primary antibodies (which can then be of the same species/isotype than the first step antibodies) and fourth the streptavidin-coupled fluorochrome (Table 1).

### *Cell sorting*

LN cells were stained as for flow cytometry analysis and sorted in the different populations. However, since LN cells are fragile, the labeling was reduced to a two-step staining (primary/secondary antibodies) in order to limit the centrifugation steps and to shorten the time before sorting. Moreover, as much as possible, the sorting was processed on fresh cells in order to improve the cell yield and viability. DAPI staining (Sigma-Aldrich) was performed to eliminate dead cells. MoFlo ASTRIOS (Beckman-Coulter, Paris, France) was used to isolate cells. FlowJo software (version X.1.0, Tree Star, Ashland, OR) were used to analyze subpopulation prevalence.

### *May-Grünwald-Giemsa staining*

Sorted cells were fixed and stained with May-Grünwald-Giemsa methods as previously described [27]. Images were acquired with a Pannoramic Scan II (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary). Pictures were analyzed using Pannoramic Viewer (3DHISTECH Ltd.).

### *RNA extraction, reverse Transcription and real-time qPCR*

Total RNA from sorted cell populations were extracted using Arcturus PicoPure RNA Isolation kit (ThermoFisher Scientific, St Aubin, France) according to the manufacturer's instructions. Qiagen RNase-Free DNase Set (Courtaboeuf, France) was used to remove contaminating DNA. Reverse transcription was made using Multiscribe reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Relative mRNA expression was evaluated using qPCR using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA). Relative gene expression was expressed according to ΔCt method. Ribosomal protein S24 (RPS24) was chosen as housekeeping gene as previously described in pig lung [27; 28]. Primers used in this publication are described in Table 2. Using the porcine new born pig trachea epithelial cell line NPTR [29] we validated Topoisomerase IIA and Cyclin B2 as transcriptomic markers of cell proliferation, since their expression in RT-qPCR were respectively 30 and 17 times higher in NPTR cells in exponential proliferation cultures compare with confluent NPTR cells. Conversely Ki67 which is a good proliferation marker at protein level was invalidated for transcriptomic studies since its expression only varied by a factor of 2 between proliferating and confluent cells (Supp Fig 1A).

### *Statistical analysis*

All data were analyzed using R software (version 3.4.0). Statistical tests are indicated in the relevant figure legend.

### *Results*

**Three different MΦ cell types can be identified and localized in the respiratory LN**

In mouse, LN MΦ have first been described according to their localization. We identified swine LN MΦ according to their LN localizations with regard to B and T cell areas. Anti-CD21$^{b}$ antibody B-Ly4 that stained mainly immature pre-class-switched B cells [30] was used to localize B cell follicles. Anti-CD8α expressed on CD8 T cells and memory/activated CD4 T cells in swine [31] was used to identify the T cell areas (Figures 1A and 1B). As previously observed in swine [13], T cell areas couldn't be clearly delineated whereas B cell follicles can be precisely identified. CD169 and CD163 markers previously used to identify swine LN MΦ [16] and mouse LN MΦ were used (for review [17]). We observed CD169 and CD163 subcapsular co-staining (Figures 1A, 1B). Because of the reverse structure of the pig LN, these peripheral cells are localized next to the efferent vessels. Interestingly, CD169 was also expressed in close association with the B cell follicles (Figure 1A, right picture). In fact, CD169$^{pos}$/CD163$^{neg}$/CD21$^{neg}$ cells appeared to be localized on a thin band on the periphery of the follicles (Figure 1A, right picture, green crescent staining). The use of CD21 staining permitted to distinguish a third subpopulation co-expressing CD169 and CD21 (Figure 1A, right picture, yellow staining inside the follicle). In fact, CD169$^{pos}$/CD163$^{neg}$/CD21$^{pos}$ cells were present in a more diffuse "crescent shape" intrafollicular area (Figure 1A). Finally, CD169$^{neg}$/CD163$^{pos}$ cells were present in the medulla, tightly associated with the lymphatic cords, both in the LN tissue as well as in the lumen of the vessels (Figure 1C, right picture, red staining).

A flow cytometry analysis of enzyme-digested LN was performed in order to isolate the 4 populations identified in previous microscopy studies. For gating strategy, the populations were first distinguished using a CD163/CD169 plot (Figure 2A). CD169$^{pos}$/CD163$^{neg}$ cells were further divided as FSC$^{low}$/CD21$^{neg}$ and FSC$^{high}$/CD21$^{pos}$ cells. The 4 populations were sorted followed by RT-qPCR or May-Grünwald-Giemsa staining in order to study morphology and ontogeny of cells (Figure 2B and 2C).

CD169$^{high}$/CD163$^{pos}$ cells presented a rounded or slightly indented nucleus with coarse

chromatin and abundant clear vacuolated cytoplasm, in agreement with a macrophagic phenotype (Figure 2B). Moreover, RT-qPCR analysis revealed that these cells highly expressed the macrophagic CSF1R, MAFB and MerTK genes (Figure 2C) validating that $CD169^{high}/CD163^{pos}$ cells are macrophages. Because of the reverse structure of the pig LN, these cells located at the periphery of the lymph node are localized next to the efferent vessels. We called them efferent MΦ (effMΦ).

$CD169^{neg}/CD163^{pos}$ cells displayed abundant clear vacuolated cytoplasm and a large deeply indented nucleus with lacey chromatin very similar to blood monocytes and to the previously described mouse LN MCM [20]. CSF1R and MerTK expression inside these cells were equivalent to the expression of effMΦ. Interestingly, MAFB expression was higher than in effMΦ (Figure 2C). Regarding to their localization both in the LN tissue as well as in the lumen of the cord vessels, these cells were called cord MΦ (cordMΦ).

$CD169^{pos}/CD163^{neg}/CD21^{neg}$ cells displayed a blue-gray cytoplasm with a grainy texture surrounding a large vesicular or slightly indented nucleus with coarsely clumped chromatin (Figure 2B). These cells expressed CSF1R and MerTK genes (Figure 2C). According to their morphology and their localization at the periphery of the follicule, these cells were called perifollicular MΦ (PFMΦ)

$CD169^{pos}/CD163^{neg}/CD21^{pos}$ cells displayed a high nucleo-cytoplasmic ratio with a large round nucleus with coarse and dense chromatin and a nucleolus, surrounded by a perinuclear halo and a rim of basophilic cytoplasm, looking very similar to bone marrow preB cells [32], in strong support with an immature B cell identity. Moreover, their localization in a semi-circular area in the periphery of the follicle ($CD169^{pos}/CD21^{pos}$ cells in Figure 1A), reminds the dark zone localization of immature, antigen activated centroblasts undergoing somatic hypermutation in mouse and man (for review see [33]). In agreement with their immature B cells MGG profile, these cells expressed none of the macrophagic markers tested, but expressed higher levels of CD19, a B cell marker, and PAX5, a regulatory gene of the somatic hypermutation process [34], which expression is characteristic of centroblastes and centrocytes differentiation steps. Regarding all these results, the cells were called $CD169^{pos}$ B cells. Although CD169 protein expression was detected by FACS (Figure 2A) and confirmed by microscopic staining (Figure

1A), CD169$^{pos}$ B cells did not present detectable amount of CD169 mRNA (Figure 2C). Conversely, CD169 mRNA quantification in MΦ (high in effMΦ, low in PFMΦ and absent of cordMΦ) was consistent with cytometry and microscopy analysis.

**Identification of 5 B cell differentiation/activation states and localization in the respiratory LN**

In order to better integrate CD169$^{pos}$ B cells inside the LN B cell differentiation steps, markers previously proposed by Sinkora et al. [35] for porcine bone marrow B cell development were used. Our Preliminary experiments demonstrate that CD21, IgM and CD2 are the more distinctive LN B cells markers. We first microscopically characterized CD169$^{pos}$ B cells according to B cell markers using a CD169/IgM/CD21 staining. The CD169$^{pos}$/CD21$^{pos}$ follicular B cells did not expressed IgM, and were mixed with CD21$^{pos}$/CD169$^{neg}$/IgM$^{neg}$ B cells in the intrafollicular crescent shape band contiguous with PFMΦ (Figure 3A). IgM$^{pos}$/CD21$^{pos}$ cells were localized in the center of the follicle. Finally, IgM$^{pos}$/CD21$^{neg}$ cells were rarely present in the center of the follicles, but well represented in extrafollicular area, as well as in the LN periphery, in direct contact with effMΦ (Figure 3A).

We completed this microscopic analysis by FACS analysis using the same first panel used for MΦ identifications, complemented with the myeloid marker CD172a and the B cell markers CD21, IgM and CD2 (Figure 3C).

The double negative CD169/CD163 cells were depicted on a CD21/IgM plot. CD21$^{pos}$/IgM$^{neg}$ cells were directly sorted, CD21/IgM double positive cells were again split in CD2$^{pos}$/FSC$^{low}$ and CD2$^{low}$/FSC$^{high}$ populations, whereas CD21$^{neg}$/IgM$^{pos}$ cell population was sorted on a restricted CD2$^{neg}$/Sirp$\alpha^{low}$ gating.

The different cell-types were sorted and stained by MGG coloration (Figure 3 D). Centroblasts displayed a large, round nucleus with multiple peripheral nucleoli surrounded by a rim of basophilic cytoplasm. Centrocytes displayed a small, round nucleus with clumped chromatin and with scant cytoplasm. Plasmablasts displayed some heterogeneity: their size was intermediate to large with scant to moderate slightly basophilic cytoplasm and a vesicular nucleus with reticular chromatin. Plasma cells demonstrated an intermediate-sized nucleus with reticular chromatin and a rim or just a crescent of clear cytoplasm with a prominent juxtanuclear archoplasm.

The sorted B cells were characterized by analyzing B cell-transcription factors genes expression

by RT-qPCR [36] (for review see [33]). CD169$^{pos}$ B cells and centroblasts (CD21$^{pos}$/IgM$^{neg}$) expressed significantly more BCL-6 (Figure 4A) than all the other B cells. BCL-6 is a master transcription factor expressed specifically in centroblasts and a majority of centrocytes [37] and involved in the inhibition of their differentiation in plasma and memory B cells [38; 39]. Centrocytes expressed intermediate levels of BCL-6, PAX5 and IRF4 as expected for these cells in an intermediate differentiation state (Figure 4A). As expected plasmablasts and plasma cells expressed the lowest levels of BCL-6 and PAX5, whereas plasma cells expressed the highest levels of IRF4 [40], XBP1 [41; 42] and Blimp1 [43; 44] (Figure 4A), 3 genes whose expression is specific of the terminally differentiated B cells. In agreement with their blastic profile in cytometry (FSC$^{high}$, sup Fig 2) and in microscopy (Figure 3C), CD169$^{pos}$ B cells and centroblasts (CD21$^{pos}$/IgM$^{neg}$) expressed significantly more the proliferation markers Topoisomerase IIA (Figure 4A) and Cyclin B2 than all the other B cells (Supp Figure 1B). These results were validated according to protein and LN localization using microscopy staining with Ki67, a protein marker of proliferating cells and BCL-6. Ki67 appeared strongly expressed in CD21$^{pos}$ and CD169$^{pos}$ cells situated in the crescent shape area of the follicle, in agreement with the phenotype and localization of CD169$^{pos}$ B cells and centroblastes (Figure 4B). Ki67 and BCL-6 co-staining demonstrated a colocalization of these two markers in the follicular crescent shape area, in concordance with the transcriptomic expression of Topoisomerase IIA and BCL-6 in CD169$^{pos}$ B cells and centroblasts (Figure 4C).
In conclusion, the phenotype, the localization, the expression of transcription factors and the proliferation of the five B cell populations are in concordance. To note, we confirm here that the CD169$^{pos}$ B cells are strongly related to centroblasts.

**CD169$^{pos}$ B cells interact closely with antigen bearing PFMΦ**

To better understand the interaction between drained antigen, PFMΦ and CD169$^{pos}$ B cells, we injected *ex vivo* red fluorescent 0.1µm beads in the tissues surrounding a tracheobronchial LN. Injected beads were let to be drained for 30 minutes at 37°C.The draining LN was then dissected and microscopically analyzed for beads sublocation. Beads were present in effMΦ and PFMΦ (Figure 5A) but not in cordMΦ (data not shown). To better define the location of the beads inside the follicle, CD169 and CD21 staining of the same LN were performed. Thanks to DAPI staining, PFMΦ appeared clearly situated in the space between the follicle and the rest of the LN (Figure 5C and D). Beads signal was mostly associated with PFMΦ although some signal

was observed deeper in the follicle associated with CD169$^{pos}$ B cells (Figure 5B). A view of the interface between intrafollicular B cells and PFMΦ is depicted in Figure 5E with DAPI and saturated CD21 staining in order to more precisely set the limit between the intrafollicular CD21$^{pos}$ cells and the PFMΦ. Once this limit was affixed on the CD169/CD21 co-staining (Figure 5F), some beads were situated inside the follicle, at the contact between PFMΦ protrusions and intrafollicular CD169$^{pos}$ B cells (Figures 5E and 5F). PFMΦ and CD169$^{pos}$ B cells closely interact with antigen drained from the peripheral tissue, at the frontier of the B cell follicle.

***In vivo* PRRSV infection of LN cells**

To get a hint of the mechanism used by PRRSV virus to persist in the LN and to delay the neutralizing immune response, *in vivo* infections were performed.

In a preliminary *in vivo* experiment, 4 animals were infected with Lena PRRSV, and 4 were mock infected. Tracheobronchial LN were collected at 10 days post infection.

Regarding their expression of CD163, effMΦ and cordMΦ were likely to be infected. Because PFMΦ didn't express CD163, we first hypothezied that these cells would not be infected and decide to cell-sort them in association to CD169$^{pos}$ B cells. We also decided to cell-sort cDC2 defined by their expression of CD172a (Sirpα), CadM1 and CD11c (supp Figure 3A) after validating their identification by RT-qPCR (supp Figure 3B). Results demonstrate that Lena infection (10 dpi) triggered effMΦ depletion (sup Figure 3C). PRRSV RNA was detected in effMΦ. Surprisingly, a 10 time weaker expression was also detected in the pooled PFMΦ/CD169$^{pos}$ B cells (sup Figure 3D).

We decided to conduct further *in vivo* infection in which PFMΦ and CD169$^{pos}$ B cells would be cell-sort separately. Three large white pigs were infected with the PRRSV FL13 strain, and three were mock infected. At 5 dpi, tracheobronchial LN cells were isolated and analyzed by flow cytometry using the same gating as in Figure 4A in order to study the different cell proportions. Upon infection, a proportional decrease of effMΦ and an increase of plasmablast were observed while no change in the proportions of the other cell types occurred (Figure 6A). The different cell populations were sorted and viral RNA detection was proceeded by RT-qPCR. In agreement with the cell population decrease, PRRSV RNA was detected in effMΦ (Figure 6B). Interestingly, PRSSV RNA was also detected in PFMΦ. No consistent PRRSV RNA was detected in the cordMΦ and the B cell compartment at the exception of a low signal in centrocytes. Thus 10 days post-Lena infection and 5 days post-FL13 infection results

demonstrate an infection and depletion of effMΦ and a detection of viral RNA in PFMΦ without depletion.

**LN Macrophages and B cells upon PRRSV infection**

Upon PRRSV/FL13 infection, LN MΦ expression of cytokines involved in B cell survival/maturation, namely IL-10, IL-21 and BAFF were studied. Infection induced the upregulation of BAFF in the 3 LN MΦ populations (Figure 7A) but did not modify IL-10 and IL-21 expressions.

We then wondered if, despite the absence of consistent PRRSV infection of B cells, the infectious context would impact their differentiation programs. We thus tested the transcriptional expression of the previously identified transcription factors, as well as the proliferation marker Topoisomerase IIA. Strikingly, $CD169^{pos}$ B cells but not centroblasts or other B cell differentiation states, presented a 2.4 time increase in BCL-6 expression, paralleled with a 1.8 time increase in Topoisomerase IIA (Figure 7B).

## *Discussion*

The means by which PRRSV alters the adaptive immune response remained largely unknown [7]. In an attempt to better understand the virus action, we sought here i) to define the MΦ populations present in the tracheobronchial draining LN and possibly involved in the respiratory adaptive immune response maturation; ii) to investigate the susceptibility to PRRSV infection of these MΦ and iii) to explore the potential impact of MΦ infection on B cell differentiation.

This task was complicated by the inverted structure of the pig LN. For instance, effMΦ population is in a subcapsular localization but we decide not to name these cells 'subcapsular sinus macrophage' (SCS MΦ) because their localization is at the exit of the LN, whereas in human and mice SCS MΦ are positioned at the entrance of the LN. Because of this distinction, pig subcapsular MΦ must have a different function compare to mouse and human SCS MΦ. Due to their localization before the efferent lymphatic, we called them efferent MΦ (effMΦ), and considered them as the likely functional equivalent of the mouse MSM, localized in the medullary sinus, just before the efferent lymphatic. Indeed their phenotype ($CD169^{pos}$/$CD163^{pos}$/$CD21^{pos}$) corresponds to the $CD169^{pos}$/$CD163^{pos}$ phenotype known for MSM [17] rather than to the phenotype of murine SSM ($CD169^{pos}$/$CD163^{neg}$) [45] (Table 3).

In mouse, these MSM have been proposed to play a role in the clearance of the lymphatic fluid before its exit to the main blood circulation [17]. Interestingly, because of the pig LN reverse structure, swine effMΦ must cover the whole periphery of the LN and are then in very large numbers compare with human and mouse MSM. Thus, pig LN might be a very good model for the study of these cells. CordMΦ are clearly positioned along the medullary cords with a phenotype similar to the mouse MCM ($CD163^{pos}$/ $CD169^{neg}$). Finally, PFMΦ appeared to be the likely equivalent of porcine SCS MΦ (Table 3). They presented a $CD169^{pos}/CD163^{neg}/CD21^{neg}$ phenotype compatible with mouse SCS MΦ and with the porcine Marginal Zone MΦ [16] thought to be the spleen equivalent of SCS [46]. Moreover, PFMΦ are localized on the contact zone with B cell follicle and could potentially performed one of the most important task described so far for SCS MΦ, which is the transport of antigens from the afferent circuit to the inside of the follicle and their transfer to follicular B cells [19; 47; 48].

We observed a $CD169^{pos}$ B cell population positioned inside the B cell follicles at the contact with PFMΦ, in a crescent-shape area reminiscent of the LN follicle dark zone as observed in HES staining in previous publications. Except their expression of CD169, these cells are $CD21^{pos}/IgM^{neg}/CD2^{neg}$. They present a proliferating cell profile ($FSC^{high}$, Topisomerase IIA, Cyclin B2 and Ki67 positive) and their MGG phenotype as well as transcription factors expression (BCL-6 and PAX5) make them belonging to the centroblaste state. Interestingly these cells exhibit CD169 proteins at their surface without detectable mRNA. This discrepancy between mRNA and protein expressions associated with the observed close interactions of the PFMΦ/$CD169^{pos}$ B cells are in support with the acquisition by intrafollicular CD21 B cells of CD169 through trogocytosis upon intimate contact with PFMΦ. Such mechanism have been previously described for lymph node cells [49]. Even if artefactual bleb exchange upon tissue digestion have been previously discovered in mouse LN between innate lymphocytes cells and SCS MΦ [50], our observation of $CD169^{pos}$ B cells in microscopy invalidate this hypothesis.

This suggestion of B cells interacting with antigen-bearing PFMΦ (equivalent to mouse SCS MΦ) in the porcine lymph node could be similar to the previously described murine SCS MΦ/B cells interaction in their relay on antigen transport from the capsule to the follicle [19; 47; 48].

After steady state LN cell profiling, we analyzed the different MΦ and B cell populations upon PRRSV infection. According to their PRRSV RNA content associated with their depletion upon infection, effMΦ are likely productively infected by both FL13 and Lena viruses. Because of effMΦ localization, replication inside these cells might favor diffusion of virus into the blood

contributing to the viremia. Moreover, their depletion might preclude them to play their role of efferent lymph scavenger, increasing the dumping of viral particles from the LN to the blood circulation.

Compared to effMΦ, PCMΦ (and cDC2) did not present consistent PRRSV RNA levels. Interestingly, PFMΦ presented as much viral RNA as effMΦ whereas these cells don't express the major PRRSV entry receptor CD163. For several viruses [47], it has been described that SCS/PFMΦ are endowed with the property to capture lymph-borne viruses for presentation to follicular B cells, being infected or not. For instance it has been observed that PRRSV virus could be transmitted through exosomes [51], and that CD169 mediated the capture of exosomes in LN [52]. Unfortunately, the scarcity and the fragility of PFMΦ did not allow us to test their capacity to replicate PRRSV *in vitro*. However, their absence of CD163 expression associated to the fact that PFMΦ did not experience depletion upon *in vivo* infection, are in agreement with an interaction with the virus without productive infection.

The PRRSV modulation of cytokines expression related to B cells homeostasis were studied in the LN MΦ. BAFF was upregulated upon PRRSV infection in the 3 LN MΦ populations whereas IL21 and IL10 were unchanged. Although limited, this information is in agreement with an adequate survival environment for activated B cells. The expression of B cell transcription factors and proliferation-related genes upon FL13 infection were measured. An increase of BCL-6 and Topoisomerase IIA expression exclusively in $CD169^{pos}$ B cells were observed. Although it is difficult to interpret this BCL-6 overexpression without a comparison with another respiratory virus triggering a normal neutralizing antibody response, the strict limitation of BCL-6 upregulation in $CD169^{pos}$ B cells lead us to hypothesize a blocking of these cells in this immature low affinity state. This blocking might be at the origin of the PRRSV-induced defect in the B cells maturation process observed by Sinkora et al. [8], linked with the production of hydrophobic binding sites autoimmune-like antibodies [53]. Interestingly these observations might be related to similar B cells maturation defects [54] as well as low-affinity autoimmune antibodies appearance [55] observed in HIV infections, in which the gp120 virus envelope protein act directly on B cell membrane proteins to trigger a polyclonal, non-protective B cell response [56].

In conclusion, we observed here a strong PRRSV signal associated with depletion of the effMΦ, in agreement with a productive infection that can participate to the viremia. Conversely, interaction of PRRSV with PFMΦ might favor an indirect or direct action of the virus on

CD169$^{pos}$ B cells and their blocking in a BCL6$^{high}$ state. Finally, the fine description of the inverted porcine LN MΦ and B cell differentiation steps will open the possibility to visualize the action of PRRSV and other porcine viruses in this main place of the adaptive immune response initiation.

**Table 1: Antibodies used for tracheobronchial lymph nodes staining for immunofluorescence and cell sorting**

| Antibody | Clone | Isotype | Species | Dilution | Supplier |
|---|---|---|---|---|---|
| **anti-CD169** | 1F1 | IgG2a | mouse | pur | J Dominguez (INIA) |
| **anti-CD21** | B-ly4 | IgG1 | mouse | 1/100 | BD Pharmingen |
| **anti-CD21-BV510** | B-ly4 | IgG1 | mouse | 1/50 | BD Pharmingen |
| **anti-CD8a** | PT81B | IgG2b | mouse | 1/100 | Monoclonal a-center |
| **anti-CD163** | 2A10/11 | IgG1 | mouse | 1/100 | Biorad |
| **anti-CD163-FITC** | 2A10/11 | IgG1 | mouse | 1/20 | Biorad |
| **anti-CD163-PE** | 2A10/11 | IgG1 | mouse | 1/20 | Biorad |
| **anti-IgM** | PG145A | IgM | mouse | 1/150 | WSU |
| **anti-CD172a/Sirpα** | 74-22-15 | IgG1 | mouse | 1/250 | WSU |
| **anti-CD2-Biot** | RPA-2-10 | IgG1 | mouse | 1/50 | eBioscience |
| **anti-Ki67-A555** | B56 | IgG1 | mouse | 1/20 | BD Pharmingen |
| **anti-BCL6** | K112-91 | IgG1 | mouse | 1/150 | BD Pharmingen |
| **anti-BCL6-PerCPCy5.5** | K112-91 | IgG1 | mouse | 1/50 | BD Pharmingen |

**Table 2: Primers used for RT-qPCR**

| Gene | Sequences (5'-3') | Gene ID | Size pb | Efficiency |
|---|---|---|---|---|
| ***CSF1R*** | F° CGGTATGTGCCCGTGTTTTG<br>R° CGATGCGTGAGCAATGTCAG | 100517086 | 86 | 0.96 |
| ***MAFB*** | F° TGCGTTCTTTAGACCAATATGTTATGT<br>R° CACCAATAACTCGCCCGCTAT | 100518227 | 71 | 0.99 |
| ***MerTK*** | F° CCGAACTCTGTAATCGCTTCTTG<br>R° TGCACTTCCGCCGTGACTA | 100519652 | 65 | 0.74 |
| ***CD169 /SIGLEC1*** | F° CAGGGGGAGTATGTGTGCTC<br>R° CCTGGGTAGATTGGGGTTCAC | 397623 | 441 | 0.98 |
| ***Topoisomerase IIA / TOP2A*** | F° TCAGCCTGGCCTTTAGCAAA<br>R° TCGTTGCCGTCTATCTTCCAT | 396917 | 67 | 0.92 |
| ***Cyclin B2 / CCNB2*** | F°AGTTTAGGCTGCTGCAGGAAAC<br>R°TGGCTGAACCTGTAAAAATCGA | 100135668 | 70 | 0.86 |
| ***Ki67 / MKI67*** | F° GCAGACGCTACCGCTCATC<br>R° GCCAAGTAACTAAGGACAGCTCTGA | 102164100 | 72 | 0.74 |
| ***CD19*** | F CAAGATGCTGACACCTATCACTGTAA<br>R TGACCGAGCAGTGACCTTCA | 397669 | 74 | 1.00 |
| ***BCL-6*** | F° CGAGAAGTGTAACCTGCATTTCC<br>R° CGTGCTTCTGGCGCAAGT | 100156549 | 64 | 0.91 |
| ***PAX5*** | F° TCACAGCATAGTGTCCACGG<br>R° CCGGCAGTGAGTGACCAT | 100520167 | 182 | 0.98 |
| ***IRF4*** | F° ACTCCCAGCTCAGGTTCACAA<br>R° GGACGAACTCCCTCCATCCT | 100144625 | 65 | 1.00 |
| ***XBP1*** | F° AGCACAGAAGCCTGTGGTTC<br>R° ACAACCTGCATGTCCTAGACC | 100217386 | 144 | 0.95 |
| ***Blimp1 /Prdm1*** | F° TGAAACTCCACAAGCGCCTAC<br>R° CCTTCAGATGGACCTTGAGGC | 12142 | 101 | 0.96 |
| ***PU-1 /SPI1*** | F° TCCCCCCTCAGCCATCA<br>R° GCGTTTGGCGTTGGTAGAGA | 414912 | 63 | 0.90 |
| ***FLT3*** | F° TGTTCACGCTGAATATAAGAAGGAA<br>R° GGAGCAGGAAGCCTGACTTG | 100515445 | 70 | 0.92 |
| ***FcεRIα*** | F CAGGTGTCCTTGAATCCCCC<br>R GGCATCTGTATTTGCCGCTG | 100152827 | 74 | 1.07 |
| ***BAFF /TNFSF13B*** | F° GGAGACGGTCCCCATCCT<br>R° AGCAGCTTCCCATCTTTGGA | 100038026 | 69 | 1.09 |
| ***IL10*** | F GAGCCAACTGCAGCTTCCA<br>R TCAGGACAAATAGCCCACTAGCTT | 397106 | 65 | 1.01 |
| ***IL21*** | F° AAATAGTCATCTGCCTGATGGTCAT<br>R° AGGCGATCTTGTCCTTGGAA | 403123 | 76 | 1.01 |
| ***N* Lena** *viral RNA* | F ATGGCCAGCCAGTCAATCAG<br>R GGAACGTTCAGTTCCGGTGA | 1494888 | 166 | 0.95 |
| ***N FL13*** *viral RNA* | F° GGGAATGGCCAGTCAGTCAA<br>R° ATCTTCAGCAGCTAGGGGGA | 1494888 | 134 | 0.95 |

**Table 3: Tracheobronchial lymph nodes macrophages comparison between mouse and swine.**

| | | ***Mouse*** | ***Swine*** |
|---|---|---|---|
| ***Antigen Entry (afferent)*** | Name | SCS MΦ | PF MΦ |
| | Location | Subcapsular & Perifollicular | Perifollicular |
| | Phenotype | $CD169^{+}/CD163^{-}$ | $CD169^{+}/CD163^{-}$ |
| | Main Function | Antigen transfer to B follicle | / |
| ***Lymphocytes exit (efferent/HEV)*** | Name | MCM | Cord MΦ |
| | Location | Medullary cord | Cord |
| | Phenotype | CD169-/ CD163+ | CD169-/ CD163+ |
| | Main Function | Plasma cells Maturation | / |
| ***Fluid exit (efferent)*** | Name | MSM | Eff MΦ |
| | Location | Medullary sinus | Subcapsular |
| | Phenotype | $CD169^{+}$ | $CD169^{+}/CD163^{+}$ |
| | Main Function | Lymph clearance before exit | / |

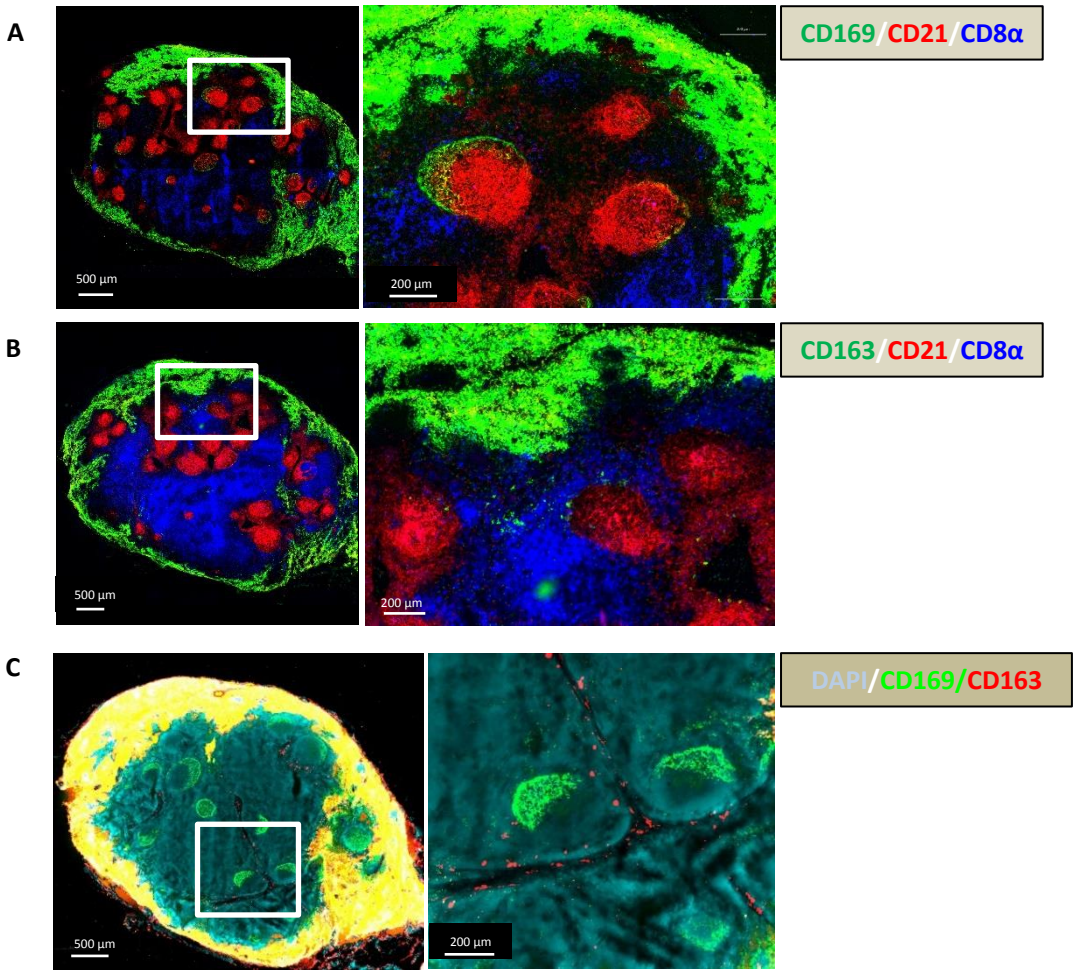



**Figure 1: Macrophages localization in the porcine tracheobronchial lymph nodes.** Whole lymph nodes cryosections were immunostained for B and T cell zones using anti-CD21 (red) and anti-CD8α (blue) antibodies respectively. A third antibody directed against CD169 (A), CD163 (B), or both (C) were added. Images are representative of at least 3 LN from different animals. Whole LN pictures are individual 10x or 20x images assembled using axiovision® software (Zeiss). Objectives used were 10x, 20x, 40x.

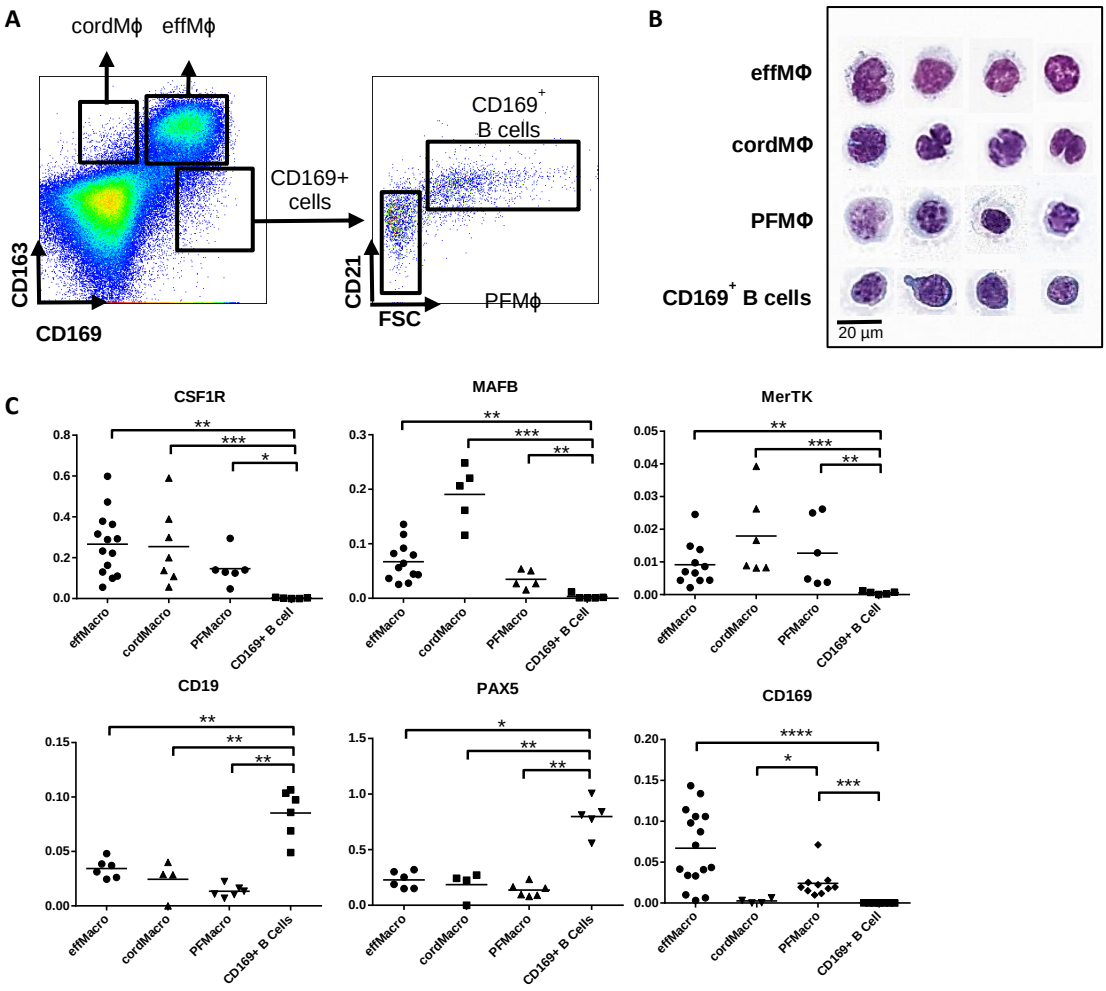



**Figure 2: Tracheobronchial lymph nodes macrophages identification.**

**A.** Representative dot plots of the LN macrophages populations by FACS analysis using CD163, CD169 and CD21. Four populations were defined: efferent macrophages (effMΦ), cord macrophages (cordMΦ), perifollicular macrophages (PFMΦ) and $CD169^{pos}$ B cells. **B.** Sorted cells were stained by a May-Grünwald-Giemsa (MGG) coloration for morphological analysis. Data are representative of 3 independent experiments. **C**. mRNA expression of macrophagic and B cell specific genes in the sorted populations by RT-qPCR. Arbitrary unit: A.U. represents $2^{-\Delta Ct}$. The Mann-Whitney's test was performed. *P-values* *<0.05, **<0.001, ***<0.0001.

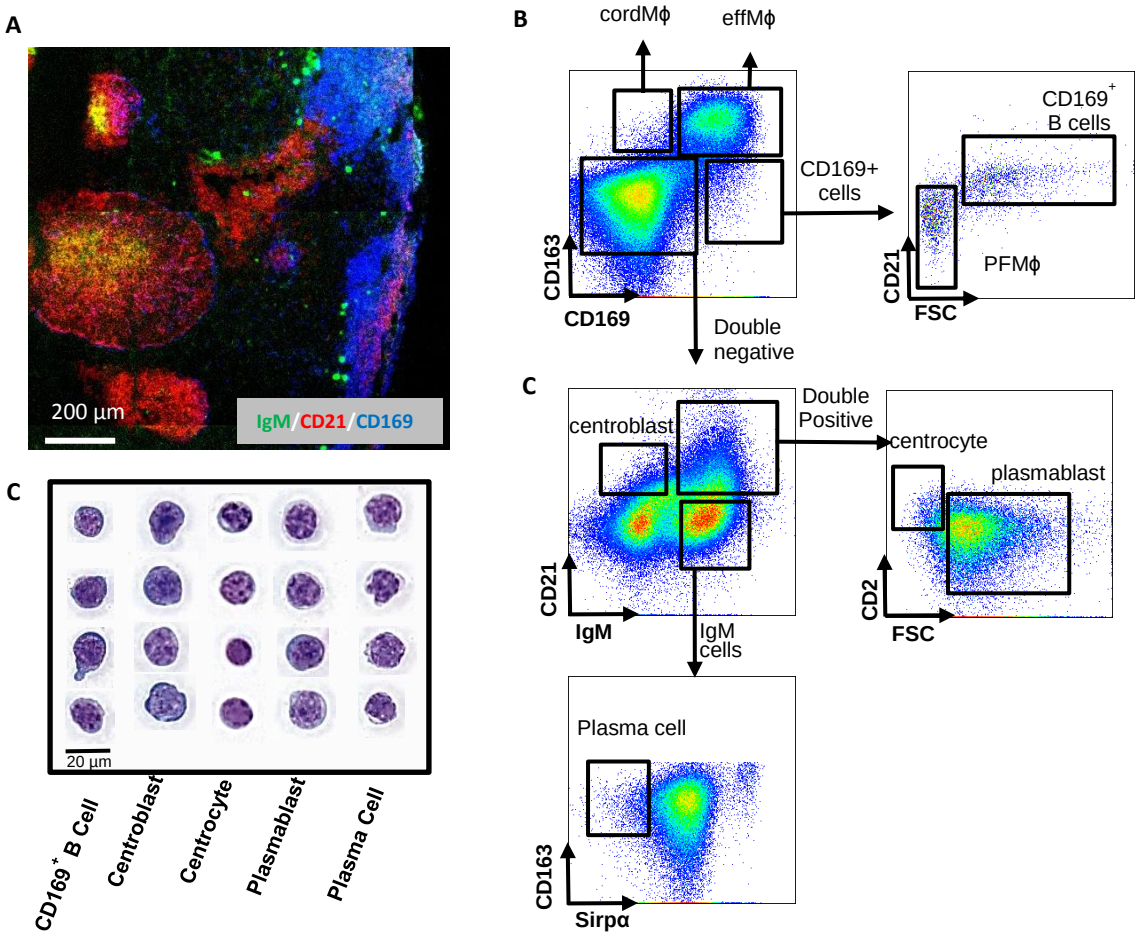



**Figure 3: B cell populations characterization in the tracheobronchial lymph nodes.** **A.** Whole lymph node cryosections were immunostained for IgM, CD21 and CD169. **B.** Representative dot plots of the LN B cell populations by FACS analysis using CD163, CD169, CD21, CD2 and IgM markers **C**. Sorted cells were spun onto slides and stained by MGG coloration for morphological analysis. Data are representative of 3 independent experiments.

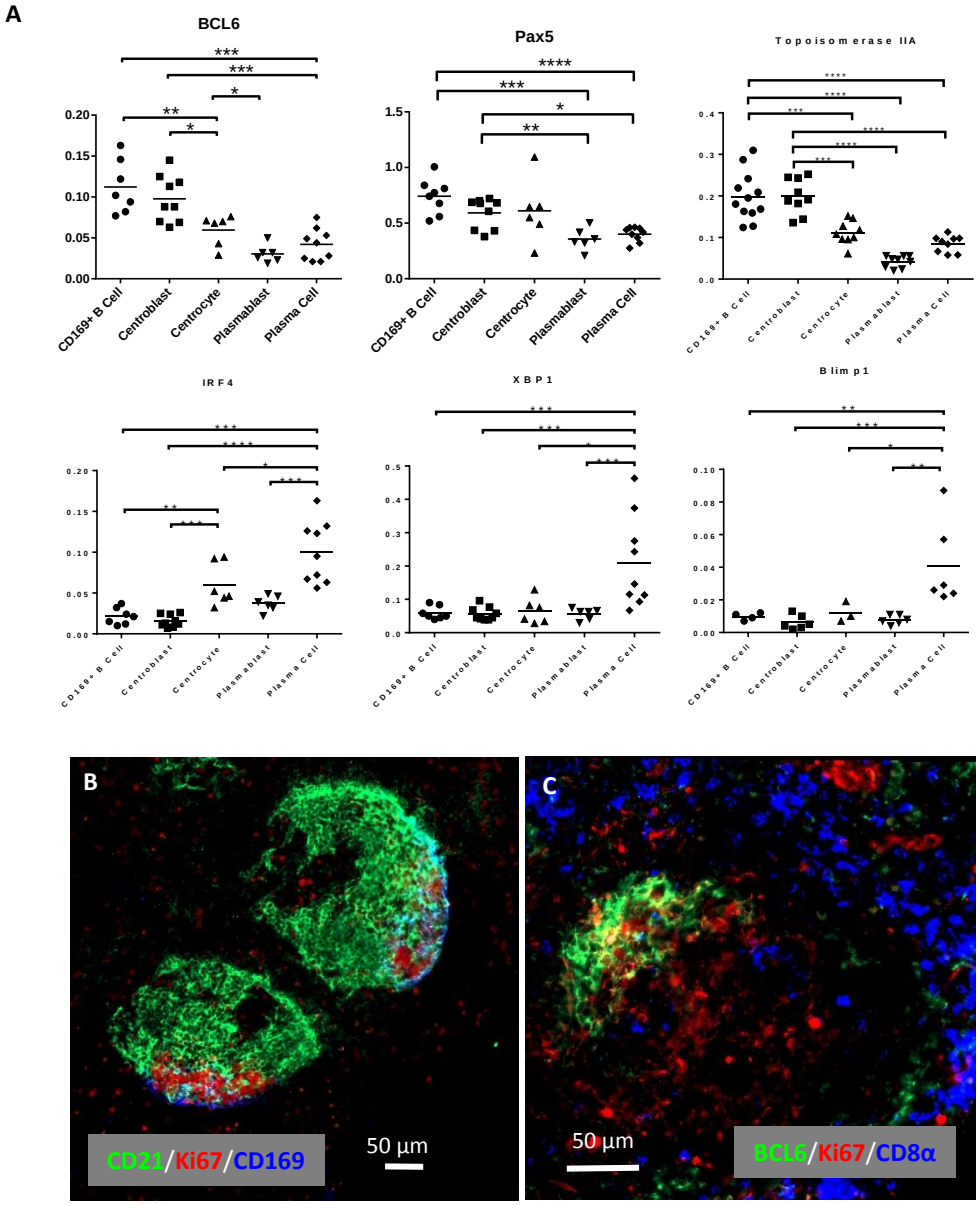



**Figure 4: Identified tracheobronchial lymph nodes B cell populations recapitulate the B cell differentiations steps.**

**A.** mRNA expression by RT-qPCR of B cell differentiation specific genes in the sorted populations defined in Figure 3B. Arbitrary unit: A.U. represents $2^{-\Delta Ct}$. The Mann-Whitney's test was performed. *P-values* *<0.05, **<0.001, ***<0.0001. **B. & C.** Whole lymph nodes cryosections were immunostained for CD21, Ki67, CD169 (Left image) or BCL-6, Ki67, CD8α (Right image).

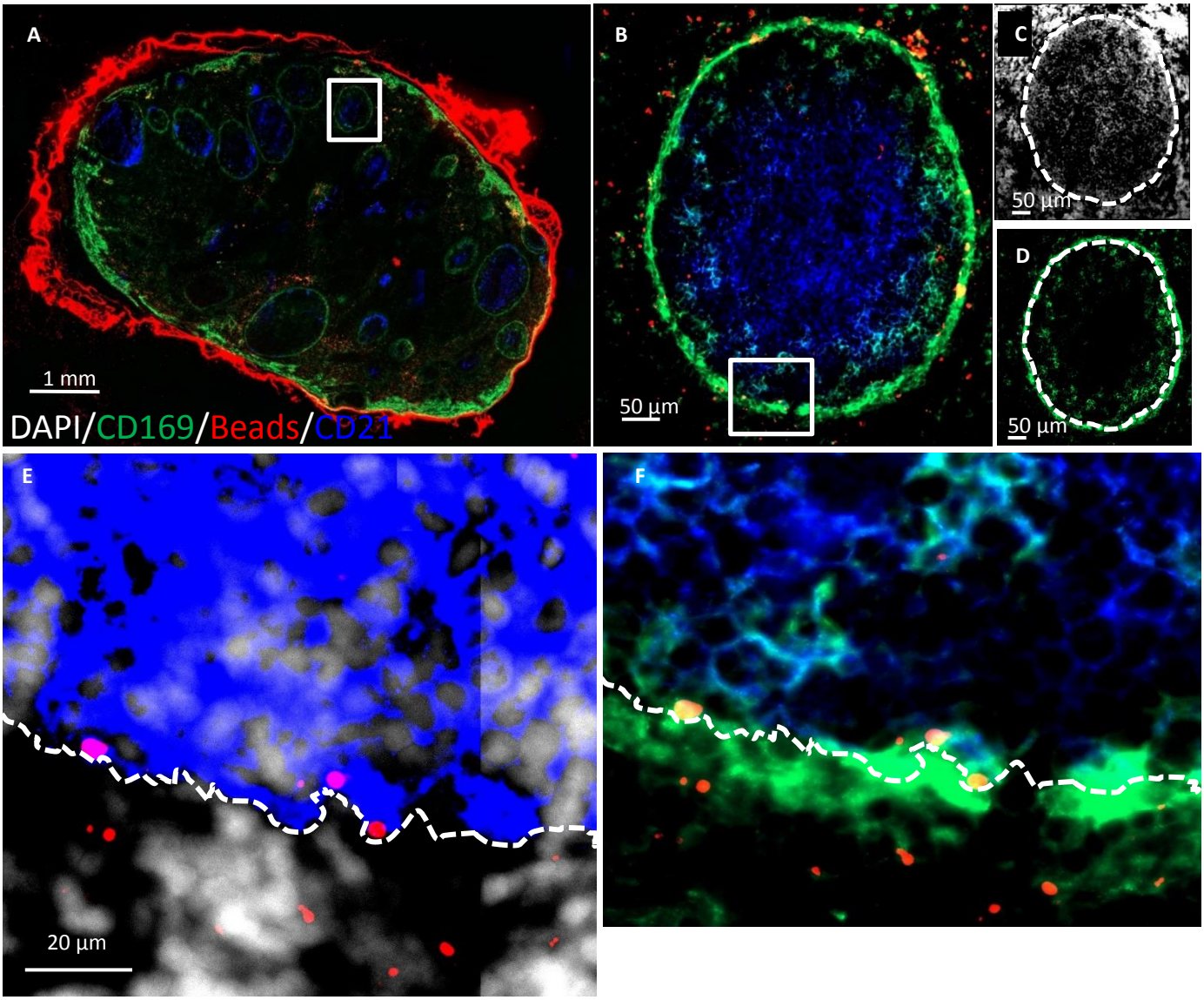



**Figure 5: PFMΦ collect tissue injected beads and interact with CD169$^{pos}$ B cells.**

Tracheobronchial explant was injected with 0,1 µm red fluorescent beads and incubated for 30 min at 37°C before preparation for staining with anti-CD169 (green) and anti-CD21 (blue) and DAPI (white).

**A**. Whole draining LN (10x objective). **B.** Entire follicle from the draining LN (White square in Figure 5A) were analyzed. Yellow spots represent red beads co-localized with CD169$^{pos}$ PFMΦ. Light blue cells are CD169$^{pos}$/CD21$^{pos}$ follicular B cells. Some intrafollicular red beads are associated with these cells. The white square delineates the area depicted in **E** and **F. C** and **D**., single color (white: DAPI, green: CD169) depicture of image **B**. the DAPI **C** picture allowed us to delineate the follicle limit (dashed line). **E.** DAPI and saturated CD21 staining allowing a more accurate delineation of the limit between the intrafollicular and the extrafollicular area. **F.** Some red beads are situated inside the follicle in contact with both PFMΦ (green) and CD169$^{pos}$ B cells (blue and green, depicted in light blue). Pictures **B** to **F** were obtained using a 63x objective.

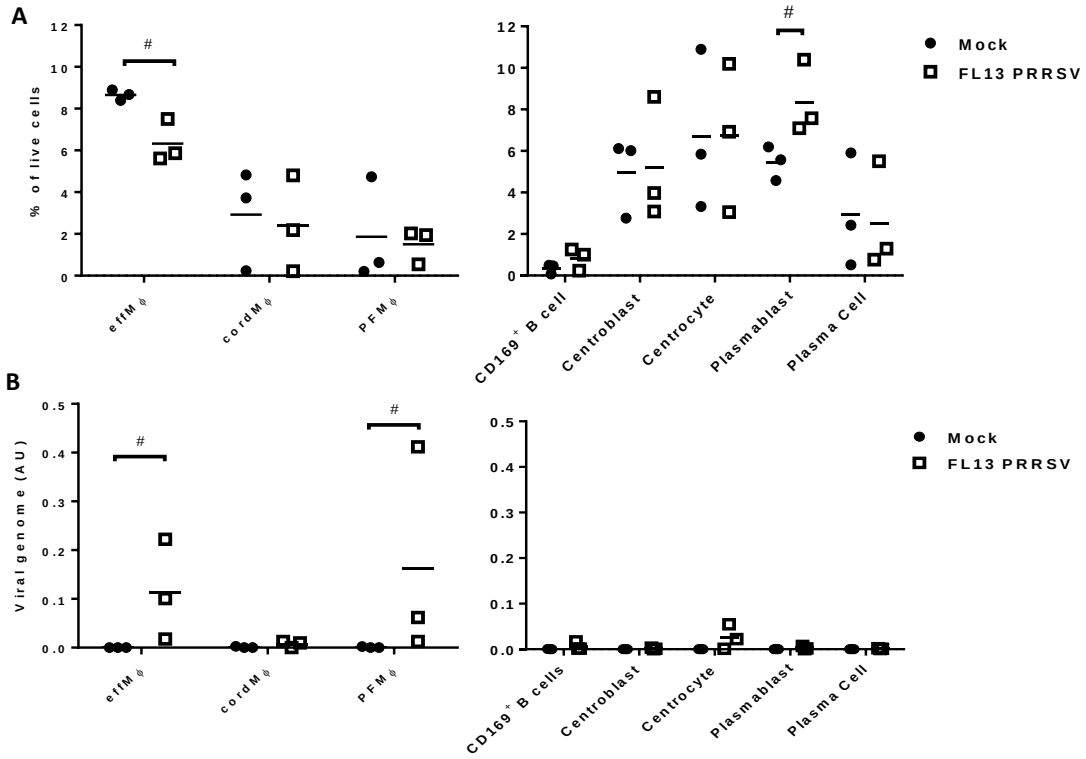



**Figure 6: effMΦ and PFMΦ interact with FL13 PRRSV.**

*In vivo* infected and control tracheobronchial LN cells were sorted using previous gating strategy. **A**. Evolution of population upon infection were analyzed as a percentage of live cells. Data are representative of 3 independent experiments. **B**. Detection of viral RNA were performed on sorted cells by RT-qPCR.

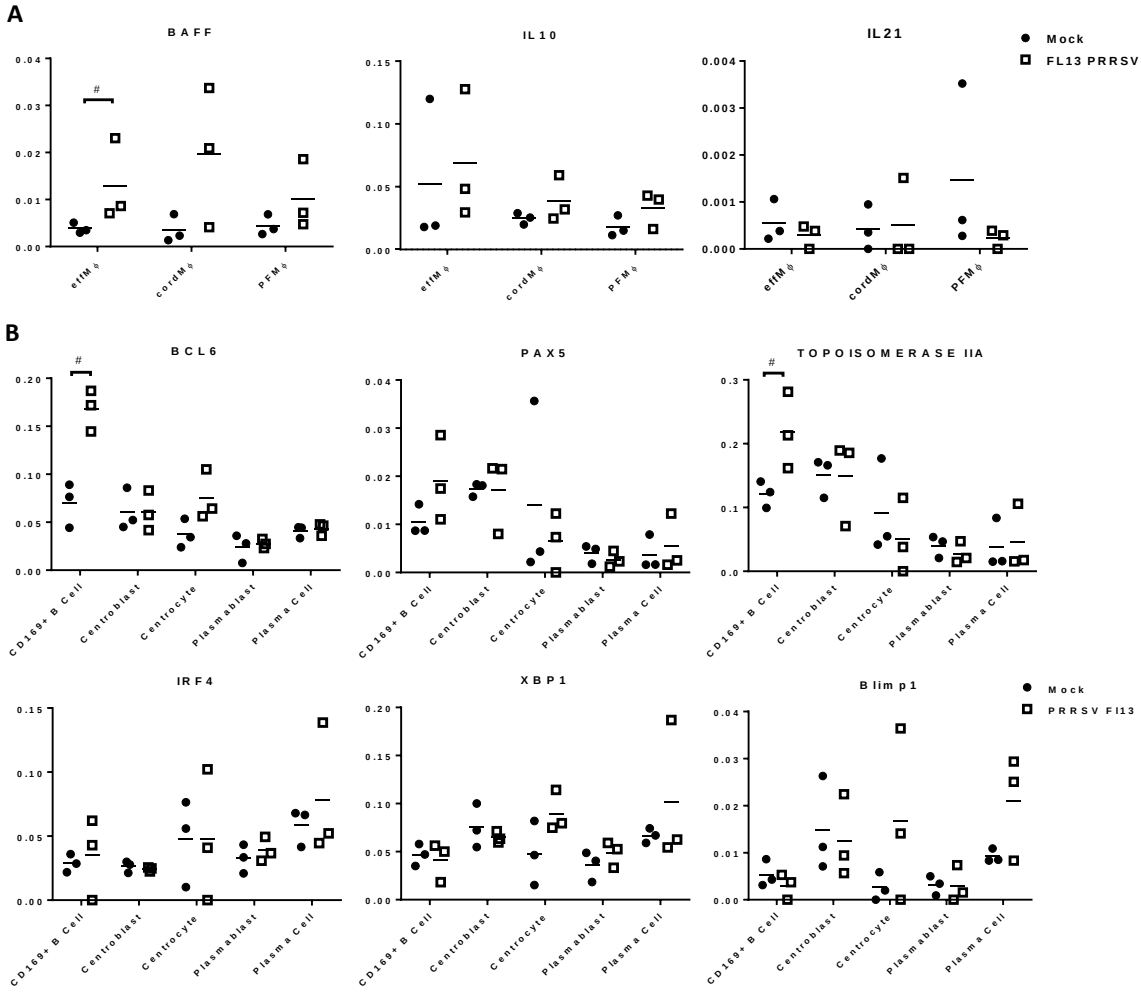
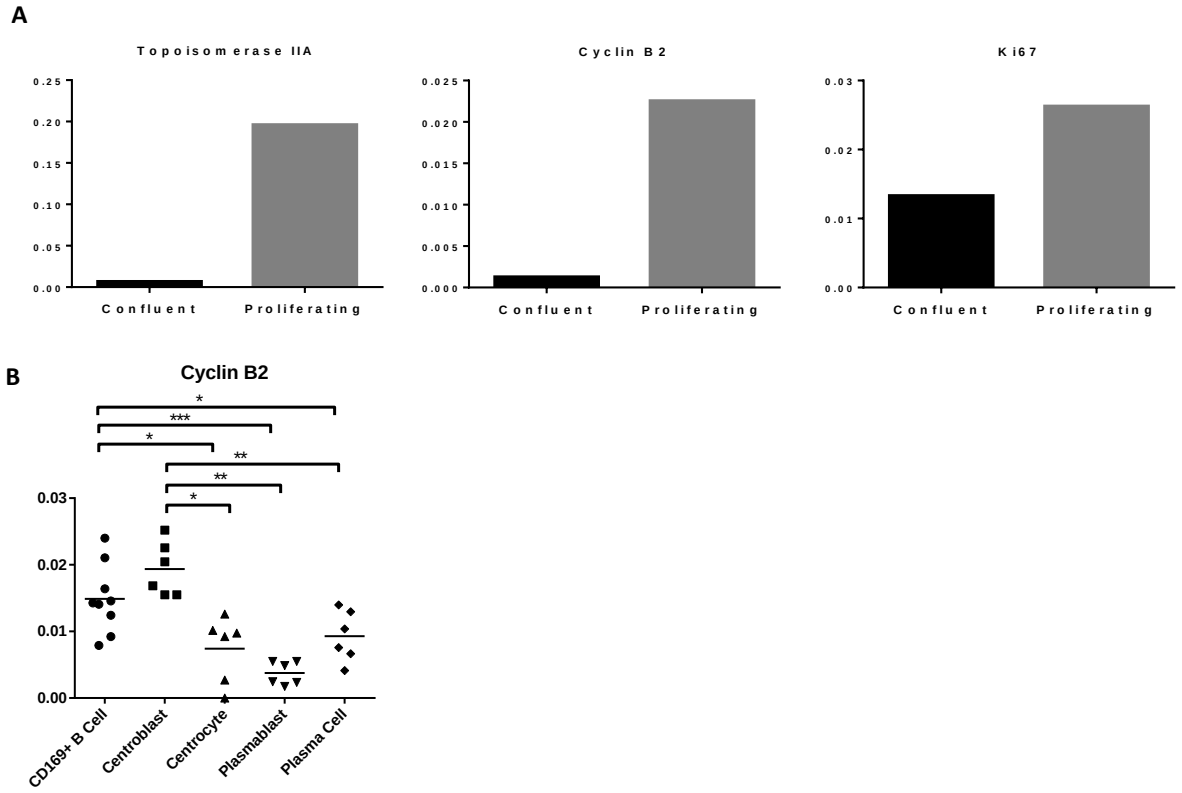



**Figure 7: PRRSV/FL13 infection triggers BAFF upregulation in macrophages and BCL-6 upregulation in CD169$^{pos}$ B cells.**

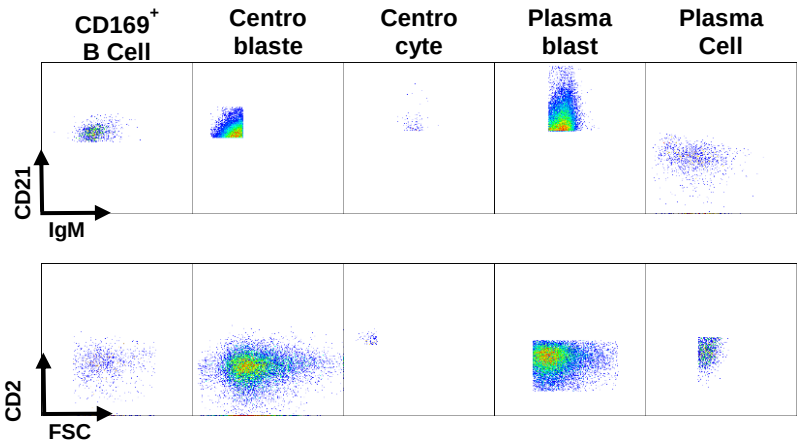
Macrophages and B cells were sorted from *in vivo* infected tracheobronchial LN at 5 days post FL13 PRRSV infection.

**A.** mRNA expression of cytokines were measured by RT-qPCR. **B.** mRNA expression of B cell transcription factors involved in the different B cell differentiation steps were measured by RT-qPCR.



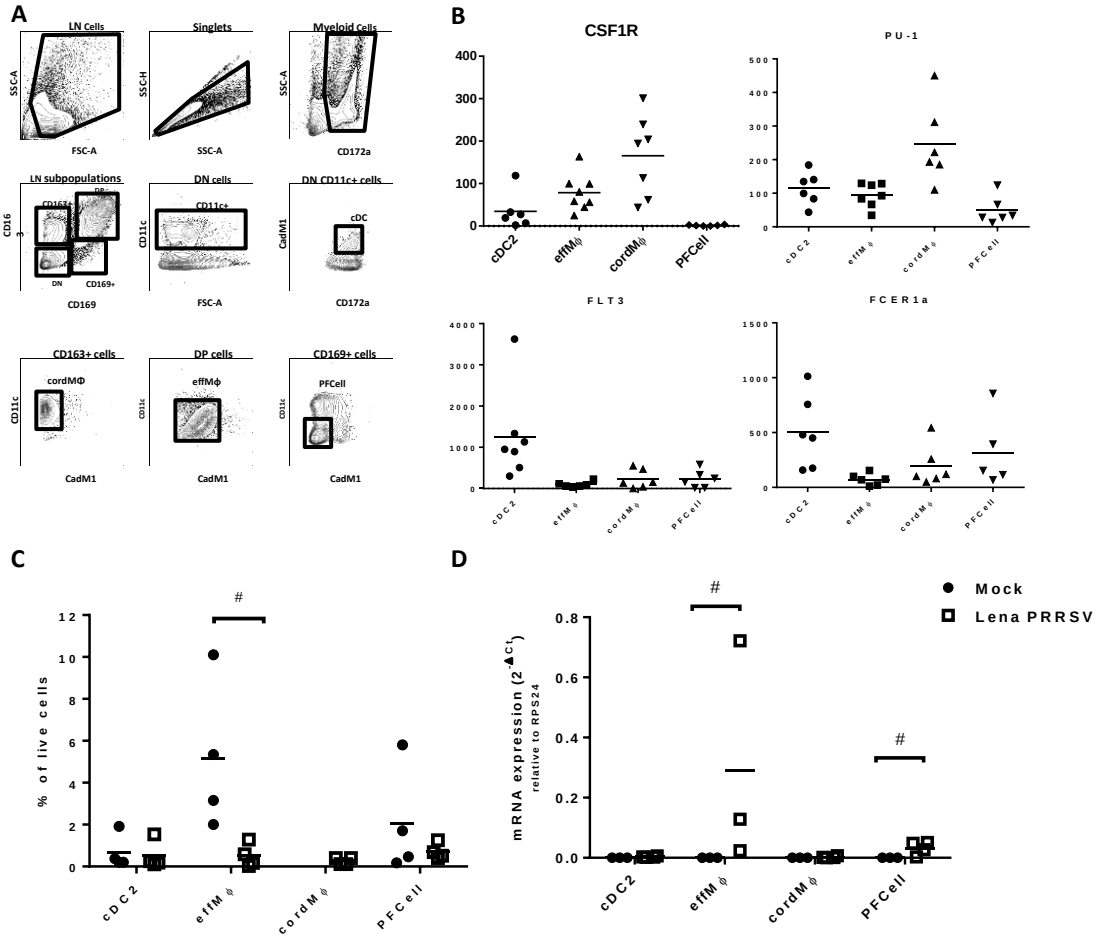

**Supp Figure 1: Use of RT-qPCR to determine B cells proliferation status.**

**A.** The porcine, trachea-epithelial cell line NPTR was harvested at confluence (confluent) or during exponential growth (proliferating). mRNA expression of Topoisomerase IIA, Cyclin B2 and Ki67 were measured by RT-qPCR. **B.** mRNA expression of Cyclin B2 in sorted B cell (related to Figure 4A).




.

**Supp Figure 2: CD21, IgM, CD2 and FSC profiles of tracheobronchial lymph nodes B cells.** LN B cell populations identified by FACS using CD163, CD169, CD21, CD2 and IgM staining were gated as in Figure 3 B. Their respective profile on CD21/IgM as well as CD2/FSC dot-plot are depicted here.




**Supp Figure 3: Lena PRRSV infection of tracheobronchial lymph nodes MΦ and DC.**

Preliminary experiment using **A.** the gating of effMΦ, cordMΦ, type 2 conventional dendritic cells (cDC2, defined as $CD163^{neg}/CD169^{neg}/CD11c^{pos}/CD172a^{pos}/CadM1^{pos}$), and perifollicular cells (PFCell) which represent a mix of PFMΦ and $CD169^{pos}$ B cells. **B.** Sorted cells were tested by RT-qPCR for macrophagic and DC specific gene expressions. Arbitrary unit: A.U. represents 2-ΔCt. **C.** Evolution of population upon infection were analyzed as a percentage of live cells. n=4. **D.** Detection of viral RNA was performed on sorted cells by RNA extraction and RT-qPCR.

## *References*


[1] J.J. Meulenberg, M.M. Hulst, E.J. de Meijer, P.L. Moonen, A. den Besten, E.P. de Kluyver, G. Wensvoort, and R.J. Moormann, Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. Virology 192 (1993) 62-72.

[2] M. Shi, T.T. Lam, C.C. Hon, R.K. Hui, K.S. Faaberg, T. Wennblom, M.P. Murtaugh, T. Stadejek, and F.C. Leung, Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. Virus Res 154 (2010) 7-17.

[3] I.S. Frydas, I. Trus, L.K. Kvisgaard, C. Bonckaert, V.R. Reddy, Y. Li, L.E. Larsen, and H.J. Nauwynck, Different clinical, virological, serological and tissue tropism outcomes of two new and one old Belgian type 1 subtype 1 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates. Vet Res 46 (2015) 37.

[4] U.U. Karniychuk, M. Geldhof, M. Vanhee, J. Van Doorsselaere, T.A. Saveleva, and H.J. Nauwynck, Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. BMC Vet Res 6 (2010) 30.

[5] N. Nieuwenhuis, T.F. Duinhof, and A. van Nes, Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. Vet Rec 170 (2012) 225.

[6] S.B. Morgan, J.P. Frossard, F.J. Pallares, J. Gough, T. Stadejek, S.P. Graham, F. Steinbach, T.W. Drew, and F.J. Salguero, Pathology and Virus Distribution in the Lung and Lymphoid Tissues of Pigs Experimentally Inoculated with Three Distinct Type 1 PRRS Virus Isolates of Varying Pathogenicity. Transbound Emerg Dis 63 (2016) 285-95.

[7] J.E. Butler, K.M. Lager, W. Golde, K.S. Faaberg, M. Sinkora, C. Loving, and Y.I. Zhang, Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. Immunol Res 59 (2014) 81-108.

[8] M. Sinkora, J.E. Butler, K.M. Lager, H. Potockova, and J. Sinkorova, The comparative profile of lymphoid cells and the T and B cell spectratype of germ-free piglets infected with viruses SIV, PRRSV or PCV2. Vet Res 45 (2014) 91.

[9] S.B. Morgan, S.P. Graham, F.J. Salguero, P.J. Sanchez Cordon, H. Mokhtar, J.M. Rebel, E. Weesendorp, K.B. Bodman-Smith, F. Steinbach, and J.P. Frossard, Increased pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance. Vet Microbiol 163 (2013) 13-22.

[10] W. Van Breedam, P.L. Delputte, H. Van Gorp, G. Misinzo, N. Vanderheijden, X. Duan, and H.J. Nauwynck, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. J Gen Virol 91 (2010) 1659-67.

[11] E. Bordet, P. Maisonnasse, P. Renson, E. Bouguyon, E. Crisci, M. Tiret, D. Descamps, C. Bernelin-Cottet, C. Urien, F. Lefevre, L. Jouneau, O. Bourry, J.J. Leplat, I. Schwartz-Cornil, and N. Bertho, Porcine Alveolar Macrophage-like cells are pro-inflammatory Pulmonary Intravascular Macrophages that produce large titers of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Sci Rep 8 (2018) 10172.

[12] X. Duan, H.J. Nauwynck, and M.B. Pensaert, Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Vet Microbiol 56 (1997) 9-19.

[13] O. Garcia-Nicolas, R.S. Rosales, F.J. Pallares, D. Risco, J.J. Quereda, S.P. Graham, J.P. Frossard, S.B. Morgan, F. Steinbach, T.W. Drew, T.S. Strickland, and F.J. Salguero, Comparative analysis of cytokine transcript profiles within mediastinal lymph node compartments of pigs after infection with porcine reproductive and respiratory syndrome genotype 1 strains differing in pathogenicity. Vet Res 46 (2015) 34.

[14] C. Revilla, T. Poderoso, P. Martinez, B. Alvarez, L. Lopez-Fuertes, F. Alonso, A. Ezquerra, and J. Dominguez, Targeting to porcine sialoadhesin receptor improves antigen presentation to T cells. Vet Res 40 (2009) 14.
[15] T. Poderoso, P. Martinez, B. Alvarez, A. Handler, S. Moreno, F. Alonso, A. Ezquerra, J. Dominguez, and C. Revilla, Delivery of antigen to sialoadhesin or CD163 improves the specific immune response in pigs. Vaccine 29 (2011) 4813-20.
[16] B. Alvarez, P. Martinez, M. Yuste, T. Poderoso, F. Alonso, J. Dominguez, A. Ezquerra, and C. Revilla, Phenotypic and functional heterogeneity of CD169(+) and CD163(+) macrophages from porcine lymph nodes and spleen. Dev Comp Immunol 44 (2014) 44-9.
[17] E.E. Gray, and J.G. Cyster, Lymph node macrophages. J Innate Immun 4 (2012) 424-36.
[18] K. Asano, A. Nabeyama, Y. Miyake, C.H. Qiu, A. Kurita, M. Tomura, O. Kanagawa, S. Fujii, and M. Tanaka, CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. Immunity 34 (2011) 85-95.
[19] T.G. Phan, J.A. Green, E.E. Gray, Y. Xu, and J.G. Cyster, Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. Nat Immunol 10 (2009) 786-93.
[20] E. Mohr, K. Serre, R.A. Manz, A.F. Cunningham, M. Khan, D.L. Hardie, R. Bird, and I.C. MacLennan, Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature. J Immunol 182 (2009) 2113-23.
[21] D.E. McFarlin, and R.M. Binns, Lymph node function and lymphocyte circulation in the pig. Adv Exp Med Biol 29 (1973) 87-93.
[22] M. Moskov, T. Schiwatschewa, and S. Bonev, [Comparative histological study of lymph nodes in mammals. Lymph nodes of the dolphin]. Anat Anz 124 (1969) 49-67.
[23] A.J.E.A. Cave, F.J.; , Lymph node structure in the Sumatran rhinoceros. J R Microsc Soc 81 (1962) 73-77.
[24] A.A.J.H. Segerstad, Beitrag zur Histologie der Lymphknoten des Elefanten, 1927.
[25] H.J. Rothkotter, Anatomical particularities of the porcine immune system--a physician's view. Dev Comp Immunol 33 (2009) 267-72.
[26] J.F. Eurell, B.L. in: Wiley-Blackwell, (Ed.), Textbook of veterinary histology, 2006.
[27] P. Maisonnasse, E. Bouguyon, G. Piton, A. Ezquerra, C. Urien, C. Deloizy, M. Bourge, J.J. Leplat, G. Simon, C. Chevalier, S. Vincent-Naulleau, E. Crisci, M. Montoya, I. Schwartz-Cornil, and N. Bertho, The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. Mucosal Immunol 9 (2016) 835-49.
[28] P. Maisonnasse, E. Bordet, E. Bouguyon, and N. Bertho, Broncho Alveolar Dendritic Cells and Macrophages Are Highly Similar to Their Interstitial Counterparts. PLoS One 11 (2016) e0167315.
[29] M. Ferrari, A. Scalvini, M.N. Losio, A. Corradi, M. Soncini, E. Bignotti, E. Milanesi, P. Ajmone-Marsan, S. Barlati, D. Bellotti, and M. Tonelli, Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. J Virol Methods 107 (2003) 205-12.
[30] M. Sinkora, K. Stepanova, and J. Sinkorova, Different anti-CD21 antibodies can be used to discriminate developmentally and functionally different subsets of B lymphocytes in circulation of pigs. Dev Comp Immunol 39 (2013) 409-18.
[31] W. Gerner, T. Kaser, and A. Saalmuller, Porcine T lymphocytes and NK cells--an update. Dev Comp Immunol 33 (2009) 310-20.
[32] M. Sinkora, and J. Sinkorova, B cell lymphogenesis in swine is located in the bone marrow. J Immunol 193 (2014) 5023-32.
[33] U. Klein, and R. Dalla-Favera, Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. Nat Rev Immunol 8 (2008) 22-33.

[34] H. Gonda, M. Sugai, Y. Nambu, T. Katakai, Y. Agata, K.J. Mori, Y. Yokota, and A. Shimizu, The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. J Exp Med 198 (2003) 1427-37.
[35] M. Sinkora, and J.E. Butler, Progress in the use of swine in developmental immunology of B and T lymphocytes. Dev Comp Immunol 58 (2016) 1-17.
[36] U. Klein, Y. Tu, G.A. Stolovitzky, J.L. Keller, J. Haddad, Jr., V. Miljkovic, G. Cattoretti, A. Califano, and R. Dalla-Favera, Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. Proc Natl Acad Sci U S A 100 (2003) 2639-44.
[37] D. Allman, A. Jain, A. Dent, R.R. Maile, T. Selvaggi, M.R. Kehry, and L.M. Staudt, BCL-6 expression during B-cell activation. Blood 87 (1996) 5257-68.
[38] S.M. Ranuncolo, J.M. Polo, J. Dierov, M. Singer, T. Kuo, J. Greally, R. Green, M. Carroll, and A. Melnick, Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. Nat Immunol 8 (2007) 705-14.
[39] R. Reljic, S.D. Wagner, L.J. Peakman, and D.T. Fearon, Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. J Exp Med 192 (2000) 1841-8.
[40] B. Falini, M. Fizzotti, A. Pucciarini, B. Bigerna, T. Marafioti, M. Gambacorta, R. Pacini, C. Alunni, L. Natali-Tanci, B. Ugolini, C. Sebastiani, G. Cattoretti, S. Pileri, R. Dalla-Favera, and H. Stein, A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. Blood 95 (2000) 2084-92.
[41] A.L. Shaffer, M. Shapiro-Shelef, N.N. Iwakoshi, A.H. Lee, S.B. Qian, H. Zhao, X. Yu, L. Yang, B.K. Tan, A. Rosenwald, E.M. Hurt, E. Petroulakis, N. Sonenberg, J.W. Yewdell, K. Calame, L.H. Glimcher, and L.M. Staudt, XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. Immunity 21 (2004) 81-93.
[42] A.M. Reimold, N.N. Iwakoshi, J. Manis, P. Vallabhajosyula, E. Szomolanyi-Tsuda, E.M. Gravallese, D. Friend, M.J. Grusby, F. Alt, and L.H. Glimcher, Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. Nature 412 (2001) 300-7.
[43] M. Shapiro-Shelef, K.I. Lin, L.J. McHeyzer-Williams, J. Liao, M.G. McHeyzer-Williams, and K. Calame, Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. Immunity 19 (2003) 607-20.
[44] C.A. Turner, Jr., D.H. Mack, and M.M. Davis, Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. Cell 77 (1994) 297-306.
[45] M. Kuka, and M. Iannacone, The role of lymph node sinus macrophages in host defense. Ann N Y Acad Sci 1319 (2014) 38-46.
[46] S. Gordon, A. Pluddemann, and S. Mukhopadhyay, Sinusoidal immunity: macrophages at the lymphohematopoietic interface. Cold Spring Harb Perspect Biol 7 (2014) a016378.
[47] T. Junt, E.A. Moseman, M. Iannacone, S. Massberg, P.A. Lang, M. Boes, K. Fink, S.E. Henrickson, D.M. Shayakhmetov, N.C. Di Paolo, N. van Rooijen, T.R. Mempel, S.P. Whelan, and U.H. von Andrian, Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. Nature 450 (2007) 110-4.
[48] T.G. Phan, I. Grigorova, T. Okada, and J.G. Cyster, Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. Nat Immunol 8 (2007) 992-1000.
[49] S. Daubeuf, A. Aucher, C. Bordier, A. Salles, L. Serre, G. Gaibelet, J.C. Faye, G. Favre, E. Joly, and D. Hudrisier, Preferential transfer of certain plasma membrane proteins onto T and B cells by trogocytosis. PLoS One 5 (2010) e8716.

[50] E.E. Gray, S. Friend, K. Suzuki, T.G. Phan, and J.G. Cyster, Subcapsular sinus macrophage fragmentation and CD169+ bleb acquisition by closely associated IL-17-committed innate-like lymphocytes. PLoS One 7 (2012) e38258.
[51] T. Wang, L. Fang, F. Zhao, D. Wang, and S. Xiao, Exosomes mediate intercellular transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). J Virol (2017).
[52] S.C. Saunderson, A.C. Dunn, P.R. Crocker, and A.D. McLellan, CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. Blood 123 (2014) 208-16.
[53] J.E. Butler, C.D. Lemke, P. Weber, M. Sinkora, and K.M. Lager, Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets: XIX. Undiversified B cells with hydrophobic HCDR3s preferentially proliferate in the porcine reproductive and respiratory syndrome. J Immunol 178 (2007) 6320-31.
[54] H.C. Lane, H. Masur, L.C. Edgar, G. Whalen, A.H. Rook, and A.S. Fauci, Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 309 (1983) 453-8.
[55] J.R. Mascola, and B.F. Haynes, HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. Immunol Rev 254 (2013) 225-44.
[56] B. He, X. Qiao, P.J. Klasse, A. Chiu, A. Chadburn, D.M. Knowles, J.P. Moore, and A. Cerutti, HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. J Immunol 176 (2006) 3931-41.

### *Discussion complémentaire*

Dans cet article, nous démontrons que les effMΦ sont infectés *in vivo* par les souches européennes FL13 et Lena. L'infection des effMΦ est plutôt attendue au vu de leur expression des récepteurs CD163 et CD169. En revanche, la détection d'ARN viral associé aux PFMΦ est plus surprenante car ces cellules n'expriment pas le récepteur CD163. Ce récepteur est considéré comme le récepteur indispensable à l'infection par le SDRPv. En effet, lorsque des porcs CD163 KO sont infectés par des souches de type 1 et 2, aucune virémie n'est détectée (Wells et al., 2017). Au vu de nos connaissances, il semble donc plus probable qu'il s'agisse d'une interaction entre le virus et les PFMΦ plutôt que d'une infection.

Nos conclusions se basent sur la détection d'ARN viral en RT-qPCR sur cellules triées. Nous avons tenté d'appuyer ces résultats par la détection de protéines virales dans des expériences de cytométrie en flux associées à des tris cellulaires et des infections *in vitro*. Malheureusement, les cellules du ganglion sont extrêmement fragiles et des phénomènes d'apoptose massifs ont été observés. Pour pallier à ces problèmes techniques, nous avons développé des cultures de coupes de ganglions entiers où les cellules conservent leurs contacts cellulaires. Ainsi, un *tissue-slicer* Krumdieck permet d'obtenir des coupes de ganglions de 200 µm d'épaisseur qui peuvent être cultivées jusqu'à 5 jours et infectées *in vitro* (Neuhaus et al., 2017). Nous avons aussi essayé de réaliser des infections *in vitro* sur cellules triées afin de collecter le surnageant pour détecter la présence de virions. Une telle expérience permettrait de prouver le caractère productif ou non de l'infection. Malheureusement, le taux de mortalité des cellules en culture n'ont pas permis d'obtenir de résultats interprétables.

Nous avons débuté des travaux sur l'étude d'éventuelles interactions entre le SDRPv et les phénomènes de différenciation des lymphocytes B dans le ganglion. Nous avons tout d'abord caractérisé les différentes étapes de différenciation des lymphocytes B. Les analyses du phénotype, de la localisation et de l'expression de facteurs de transcription ont permis d'identifier 5 étapes de différenciation des lymphocytes B. Parmi ces populations, les lymphocytes B CD169$^{pos}$ sont localisés à la périphérie du follicule en contact étroit avec les PFMΦ. Il serait intéressant de pouvoir étudier plus précisément les interactions entre ces 2 types cellulaires. Dans nos travaux, nous avons détecté une expression plus importante de *BCL-6* dans les lymphocytes B CD169$^{pos}$ collectés 6 jours après une infection *in vivo* par la souche FL13. Cette augmentation d'expression est concomitante avec une expression plus importante du gène codant pour la cytokine *B-cell activating factor* (BAFF) dans les 3 populations de macrophages

identifiés. Il serait intéressant d'étudier si ces augmentations sont spécifiques du SDRPv.

Afin d'étudier plus précisément l'impact de l'infection sur la différenciation des B, il serait envisageable de réaliser des infections *in vivo* avec le virus du SDRPv et le virus de la grippe pour comparer les réponses induites dans le ganglion par ces infections. Dans notre étude, les ganglions ont été collectés 6 jours après l'infection afin d'observer les phénomènes précoces dans la mise en place de la réponse humorale. De nouvelles études pourraient permettre de réaliser des cinétiques en collectant les ganglions à différents temps post-infection afin d'avoir une vision plus dynamique d'éventuelles perturbations induites par l'infection SDRPv. Nous envisageons aussi d'utiliser des prélèvements sanguins pour étudier l'évolution des populations de lymphocytes B après infection. Nous pourrions ainsi identifier si le profil des populations est identique à d'autres infections virales ou s'il existe des déséquilibres. Dans les études de Butler *et al.*, les auteurs suggèrent qu'une prolifération polyclonale de LB naïfs avec expansion du répertoire pré-immun pourrait être à l'origine du retard dans l'établissement de la réponse humorale neutralisante (revue (Butler et al., 2014)).

Dans nos travaux, nous nous sommes focalisés sur les macrophages en utilisant comme première approche leur expression des récepteurs CD163 et CD169. Cette approche a permis d'identifier 3 populations de macrophages du ganglion de porc. Néanmoins, il a été montré chez la souris que les macrophages présents dans la zone T (*T cell zone macrophage* ; TZM) n'expriment pas les marqueurs CD163 et CD169 (Baratin et al., 2017). Chez la souris, les TZM peuvent être caractérisés par leur profil MerTK+/CX3CR1+/CD169-. Dans le cas du porc, nous ne disposons pas d'anticorps dirigés contre MerTK et CX3CR1 et d'autres marqueurs seraient nécessaires pour identifier ces cellules. L'identification des TZM et des sous-populations de DC dans le ganglion pourrait permettre d'étudier le rôle de ces cellules dans le ganglion et leur interactions.

Il serait aussi intéressant de réussir à identifier les fDC dans le ganglion de porc. Les fDC peuvent jouer le rôle de réservoir viral et conserver des antigènes pour une longue durée (revue (Heesters et al., 2016)). Pour essayer de caractériser les fDC chez le porc, des analyses de cytométrie en flux pourraient permettre d'identifier des cellules négatives pour CD45 et positives pour CD16 et CR2 (aussi appelé CD21). Les fDC potentielles pourraient aussi être identifiées par leur production de CXCL13, IL-6 et BAFF.

# Discussion générale et perspectives

## *Interaction entre SDRPv et macrophages*

Dans nos travaux, nous démontrons l'infection des AM et des PIM dans le poumon ainsi que des effMΦ dans le ganglion par une ou plusieurs souches européennes. Comme pour les AM, l'infection des PIM et des effMΦ est concomitante avec une diminution de la fréquence de ces cellules dans leur organe respectif. Le SDRPv est connu pour avoir un caractère cytolytique dans les AM et il est possible que l'infection des macrophages diminue les capacités de clairance virale tout en augmentant la production de virions dans le sang et donc la virémie. De nouveaux travaux pourraient permettre d'élucider le rôle exact des PIM lors de l'infection. Nous avons montré que les PIM sont intravasculaires et fortement infectés. Il s'est avéré qu'en analyse par composante principale (ACP) la charge virale dans les PIM était corrélée à la virémie suggérant un rôle majeur de ces cellules dans la production de virions dans le sang. Malheureusement, un nombre plus important d'individus serait absolument nécessaire afin d'asseoir de telles conclusions. Des expériences de déplétion des PIM par l'injection intravasculaire de liposomes de chlodronate couplées à un suivi de la cinétique de virémie pourraient permettre de tester une telle hypothèse.

Les effMΦ expriment CD163 et CD169 tout comme les AM et les AM-like. Alors que CD163 est absolument nécessaire à l'infection, CD169 a un rôle moins prépondérant. Récemment, Siglec-10 a été identifié comme un nouveau récepteur impliqué dans les mécanismes d'entrée du SDRPv de type 2. Ce récepteur pouvant se substituer à CD169 (Xie et al., 2017). La découverte d'une infection de cellules CD169 négatives ne semblerait donc pas surprenante. La surprise dans nos travaux provient d'une détection d'ARN viral associé aux PFMΦ qui sont CD169 positives mais qui expriment très faiblement CD163. Comment expliquer un tel résultat au vu de la bibliographie ? Il sera nécessaire de valider cette détection par des approches différentes de la RT-qPCR. A ce jour, nous avons tenté des approches par FACS afin de détecter des protéines virales dans le cytoplasme. Malheureusement, les cellules du ganglion s'avèrent extrêmement fragiles. Leur culture aboutit à des phénomènes d'apoptose massifs. Pour pallier à ces difficultés, l'utilisation d'un *tissue-slicer* Krumdieck permet d'obtenir des coupes de 200 µm d'épaisseur où les cellules maintiennent leurs contacts cellulaires d'origine (Hoffmann et al., 1995). Nous espérons que l'utilisation d'une telle approche permettra de réduire considérablement l'apoptose dans nos échantillons et de vérifier

notre hypothèse sur les PFMΦ *in vitro*. Imaginons que contrairement à notre hypothèse, l'infection des PFMΦ se révélait indubitable, il deviendrait alors passionnant de comprendre les mécanismes d'infection de ces cellules. En effet, récemment de nouveaux modes de transmission du SDRPv ont été découverts *in vitro*. Ces modes de transmission alternatifs ne sont pas liés à la présence de CD163. Il s'agit de nanotubules intercellulaires capables de transmettre de l'ARN viral, des réplicases et des protéines non-structurales (Guo et al., 2016) ainsi que des exosomes produits par les cellules infectées (Wang et al., 2017). Il faut noter que l'existence de ces modes de transmission *in vivo* et leurs rôles exacts dans l'infection restent à définir. En 2014, il a été montré que le récepteur CD169 était impliqué dans la capture d'exosomes au sein du ganglion (Saunderson et al., 2014).

Quant à la diminution de la fréquence des effMΦ après l'infection par le SDRPv: est-ce un élément nécessaire ou favorisant la mise en place de la réponse immunitaire dans le ganglion ? Il est envisageable que ces cellules soient très permissives à de nombreux pathogènes. Néanmoins, une telle hypothèse lève la question du renouvellement de ces cellules et de leur origine ? Ces résultats ouvrent des questions qui jusqu'alors restent en suspens : Cette diminution est-elle spécifique du SDRPv ? Ces cellules sont-elles capables de s'auto-renouveler ? Comment le système immunitaire pourrait-il pallier à une telle diminution après une infection afin de faire face à d'autres pathogènes ?

Au vu de l'état de l'art, il est probable que d'autres cibles cellulaires du SDRPv n'aient pas encore été découvertes. Dans notre étude, nous avons identifié des macrophages infectés que nous avons nommé « MΦ CMH-II *low* ». De nombreuses questions émergent de ce résultat : S'agit-il de macrophages identiques aux AM et PIM mais avec un état d'activation différent ? Quelle est la localisation exacte de ces cellules présentes aussi bien dans le lavage broncho-alvéolaire que dans le tissu pulmonaire ? Ces cellules sont-elles d'origine embryonnaire ou hématopoïétique ?

### *Interaction entre SDRPv et cellules dendritiques*

Dans nos travaux, nous avons montré que les cellules dendritiques cDC1, cDC2 et moDC du poumon n'étaient pas infectées par les souches européennes FL13, LV et Lena. Nos résultats sont basés sur la détection de l'ARN viral par RT-qPCR et la détection de protéines virales par immunomarquage. Ces travaux sont les premiers à étudier l'infection de DC

primaires par le SDRPv de type 1 dans le poumon. Nous avons connaissance d'études menées actuellement en Europe qui semblent aboutir à une conclusion similaire pour les DC du sang périphérique (données non publiées). Cette non-infection pourrait être une différence majeure avec les souches de type 2 où un consensus semble exister sur l'infection des DC. Néanmoins, dans le cas du type 2, les mécanismes d'entrée du virus dans les DC n'ont jamais été élucidés et la plupart des études se basent sur des infections *in vitro* de moDC ou de bmDC en utilisant les cytokines GM-CSF (Auray et al., 2016) ou GM-CSF/IL-4 (Weesendorp et al., 2013). Il serait nécessaire de répéter nos expériences sur des moDC et des cDC *in vivo* avec des souches de type 2.

Concernant les DC présentes dans les ganglions, nous n'avons pas fait de leur identification une priorité dans nos travaux au vu des résultats obtenus sur le poumon qui établissent la non-infection de ces cellules par le SDRPv. Nous avons néanmoins réussi à identifier les cDC2. Il serait très intéressant de réussir à isoler l'ensemble des sous-populations de DC qu'elles soient migrantes ou résidentes. Des premiers essais de tris utilisant l'expression de CMH-II comme critère de différenciation des DC migrantes et résidentes ont donné des résultats encourageants dans notre laboratoire. En effet, l'augmentation de l'expression de CMH-II à la membrane des DC migrantes peut être utilisée pour les identifier (Granot et al., 2017). Néanmoins, il est possible que dans le cas du SDRPv, l'existence d'une virémie conduise à une maturation des DC résidentes des organes lymphoïdes secondaires. L'identification et l'isolement des DC dans le ganglion pourraient permettre de vérifier si le SDRPv impacte négativement la migration des DC vers cet organe et leur maturation. Pour cela, il serait envisageable de comparer la migration des DC après des infections *in vivo* avec le SDRPv et un virus considéré comme non-immunosuppressif comme le virus de la grippe. En effet, on peut imaginer que si la migration des DC n'est pas optimale après une infection par le SDRPv cela pourrait impacter les phénomènes de présentation d'antigène au sein du ganglion, la création des centres germinatifs et la production d'anticorps de fortes affinités.

Il faut noter que lors de nos travaux, nous n'avons pas réussi à caractériser les pDC dans le poumon de porc alors qu'une telle caractérisation a été réalisée dans le sang. Il serait intéressant d'entreprendre une identification des pDC dans le poumon et d'étudier l'impact de l'infection par différentes souches européennes sur les fonctionnalités de ces cellules. Dans nos

travaux, il est clair que la souche Lena se différencie des autres souches européennes dans sa capacité d'induction de la réponse immunitaire. Ces travaux font échos aux résultats d'autres équipes qui ont montré que la souche Lena n'interagissait pas de la même manière avec les pDC du sang que les autres souches européennes. En effet, la souche Lena n'a pas la capacité d'activer les pDC *in vitro* de manière directe, seule une activation médiée par un contact entre pDC et macrophages infectés a été observée (García-Nicolás et al., 2016). Il serait donc très intéressant de vérifier si un tel résultat se reproduit avec des pDC isolées depuis le poumon de porcs infectés. De plus, il a été montré dans le sang de porc que les pDC expriment le TLR7 et le TLR9 que les cDC1 expriment le TLR9 et que les cDC2 expriment le TLR7 (Auray et al., 2016). Dans des travaux en cours de RNA-seq sur DC primaires du poumon, nous comptons étudier l'expression des TLR sur les cDC1, cDC2 et moDC. L'étude de l'expression des TLR sur les DC du poumon couplée à l'étude de l'état d'activation des DC selon les souches européennes utilisées pourraient fournir des indices sur d'éventuels mécanismes à l'origine des différences d'interaction entre DC et virus.

### *Réponse cellulaire*

Dans notre étude, le virus ne se réplique pas dans les DC. De plus, nous n'avons pas pu mettre en évidence une diminution d'expression des protéines de co-stimulation à leur surface. Néanmoins, une différence entre les souches européennes existe. Seule la souche virulente Lena est capable de polariser une réponse Th1 *via* une interaction avec les DC. Ce résultat obtenu par MLR *in vitro* appuie l'hypothèse émise par Salguero *et al.* selon laquelle les souches virulentes activeraient plus les DC que les souches peu virulentes. Cette activation plus forte favoriserait une forte réponse cellulaire ainsi qu'une aggravation des symptômes cliniques liée à une forte inflammation (Salguero et al., 2015). Nos travaux de transfert cellulaire *in vivo* semblent appuyer cette hypothèse. En effet, le transfert de lymphocytes T mémoires spécifiques du SDRPv diminue la courbe de survie après infection, soulignant un rôle potentiel d'une réponse cellulaire délétère dans le cas de l'infection Lena. Malheureusement, il serait nécessaire d'avoir pu disposer de groupe contrôle où les porcs auraient été transférés avec des PBMC naïfs.

Dans les travaux précédents du laboratoire, il a été montré que les cDC1 sont les principaux acteurs de la polarisation Th1 dans le poumon. Il conviendrait de vérifier que la

réponse Th1 que nous avons observé avec la souche Lena provient bien d'une activation des cDC1. Nous avons observé que le profil cytokinique des cDC1 était modifié après une infection Lena *in vivo*, en faveur de l'hypothèse d'une activation de ces cellules. Néanmoins, la preuve directe que l'activation des cDC1 par Lena est à l'origine de la polarisation Th1 observée *in vitro* n'a pas été établie. Des expériences complémentaires seront nécessaires afin d'élucider le rôle exact des cDC1.

En 2014, une souche virulente de type 1.1 a été découverte en Italie et nommée PRRSV.1_PR40 (Canelli et al., 2017). L'étude de cette souche a révélé une virémie très élevée, de forts signes cliniques (température et dyspnée) et de nombreuses lésions dans les tissus. Au niveau des PBMC, la souche virulente italienne PR40 induit une forte déplétion des monocytes notamment d'une sous-population Sirp$\alpha^{+}$CD14$^{+}$CD163$^{+}$ après 7 jours d'infection mais une forte augmentation des lymphocytes T mémoires (CD3$^{+}$CD4$^{+}$CD8$\alpha$+) et des lymphocytes cytotoxiques (CD3$^{+}$CD4$^{-}$CD8$\alpha^{+}$CD8$\beta^{+}$) après 17 jours d'infection. Cette induction de lymphocytes T est entre 3 et 4 fois plus importante que celle observée avec une souche peu virulente de type 1.1. Dans nos travaux, il aurait été très intéressant d'inclure la souche italienne de type 1.1 afin de pouvoir la comparer à la souche Lena. De plus, l'appartenance de cette souche au même type que les souches LV et FL13 pourrait permettre d'évaluer si la polarisation Th1 observée avec la souche Lena est bien un caractère commun aux souches virulentes (Ferrari et al., 2018).

### *Réponse humorale*

L'infection par le SDRPv se caractérise par une production rapide d'anticorps non-neutralisants alors que les anticorps neutralisants apparaissent après 1 mois d'infection. L'étude de la réponse cellulaire face au SDRPv a montré des différences entre les souches européennes. Par opposition, le retard dans la mise en place de la réponse humorale semble commun à toutes les souches. Dans nos travaux, nous avons détecté une modulation de l'expression de *BCL-6* dans les lymphocytes B CD169$^{pos}$. Il sera nécessaire de valider une telle modulation au niveau protéique car des mécanismes de modifications post-transcriptionnelles sont connus dans la régulation de *BCL-6* (revue (Klein et al., 2008)). Il sera aussi indispensable de vérifier si ce résultat est spécifique du SDRPv ou s'il fait partie des phénomènes normaux lors d'une infection virale.

Dans nos travaux, nous avons mis en évidence une association du SDRPv avec les PFMΦ dans le ganglion. Ces macrophages se trouvent à la périphérie des follicules au contact direct des lymphocytes B $CD169^{pos}$. Les PFMΦ semblent être les équivalents des SCSMΦ identifiés dans d'autres espèces, or il a été supposé que les SCSMΦ sont susceptibles à de nombreux pathogènes afin de permettre la concentration des antigènes dans le ganglion (revue (Gray & Cyster, 2012)). La localisation des PFMΦ pourrait suggérer une interaction étroite avec les lymphocytes B. Malheureusement, il sera sûrement difficile de pouvoir étudier leur rôle exact et leur interaction avec les LB car une déplétion spécifique de ces macrophages semble compliquée et recréer un environnement aussi complexe que celui du ganglion *in vitro* sera une tâche complexe.

Parmi les cellules qui n'ont pas encore été identifiées dans le ganglion de porc se trouvent les fDC. Il a été montré que les fDC peuvent être des réservoirs viraux. En effet, les fDC sont capables de stocker sur une longue période des antigènes non-dénaturés dans des vésicules endosomales. Ces vésicules fusionnant avec la membrane cellulaire de manière périodique et pouvant libérer des virions infectieux. Ce mécanisme a notamment été décrit dans le cas du VIH (Heesters et al., 2014). Les fDC jouent aussi un rôle dans la rétention et la concentration de l'antigène nécessaires à la formation des centres germinatifs. Les fDC sont donc essentielles dans la maturation des lymphocytes B. Il serait alors passionnant d'identifier les fDC dans le ganglion de porc, d'étudier si ces cellules sont permissives au virus SDRPv des types 1 et 2, si le virus persiste dans ces cellules sur une longue durée et d'étudier l'interaction entre le virus et les fDC. Pour cela, des expériences *in vivo* peuvent être envisagées où des ganglions de porc seraient collectés à différents temps post-infection et où la présence du SDRPv serait suivie en microscopie.

Pour conclure l'ensemble de ces travaux, des approches de microscopie, de cytométrie en flux et de tris cellulaires ont permis d'approfondir les connaissances sur les cellules immunitaires du porc à l'état basal et lors d'infections par le SDRPv. Il a été montré que les DC ne sont pas infectées *in vivo* par les souches de type 1 alors que les AM-like et les effMΦ sont susceptibles à l'infection. Ces approches ont permis d'identifier les macrophages et les lymphocytes B dans le ganglion et ouvrent de nouvelles pistes pour l'étude de la réponse

immunitaire du porc.

# Réferences


Albina, E., Carrat, C., & Charley, B. (1998). Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *18*(7), 485–490.

Allende, R., Lewis, T. L., Lu, Z., Rock, D. L., Kutish, G. F., Ali, A., … Osorio, F. A. (1999). North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *Journal of General Virology*, *80*(2), 307–315.

Alvarez, B., Martínez, P., Yuste, M., Poderoso, T., Alonso, F., Domínguez, J., … Revilla, C. (2014). Phenotypic and functional heterogeneity of CD169+ and CD163+ macrophages from porcine lymph nodes and spleen. *Developmental & Comparative Immunology*, *44*(1), 44–49.

Amarilla, S. P., Gómez-Laguna, J., Carrasco, L., Rodríguez-Gómez, I. M., Caridad Y Ocerín, J. M., Morgan, S. B., … Salguero, F. J. (2015). A comparative study of the local cytokine response in the lungs of pigs experimentally infected with different PRRSV-1 strains: upregulation of IL-1α in highly pathogenic strain induced lesions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *164*(3–4), 137–147.

An, T.-Q., Tian, Z.-J., Leng, C.-L., Peng, J.-M., & Tong, G.-Z. (2011). Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Asia. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(9), 1782–1784.

Ansari, I. H., Kwon, B., Osorio, F. A., & Pattnaik, A. K. (2006). Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, *80*(8), 3994–4004.

Auray, G., Keller, I., Python, S., Gerber, M., Bruggmann, R., Ruggli, N., & Summerfield, A. (2016). Characterization and Transcriptomic Analysis of Porcine Blood Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells Reveals Striking Species-Specific Differences. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *197*(12), 4791–4806.

Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., … Kroczek, R. A. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c $^{+}$ CD141 $^{+}$ cells as homologues of mouse CD8 $^{+}$ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(6), 1273–1281.

Bain, C. C., Bravo-Blas, A., Scott, C. L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., … Mowat, A. M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nature Immunology*, *15*(10), 929–937.

Bain, C. C., Scott, C. L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., … Mowat, A. M. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunology*, *6*(3), 498–510.

Bannard, O., & Cyster, J. G. (2017). Germinal centers: programmed for affinity maturation and antibody diversification. *Current Opinion in Immunology*, *45*, 21–30.

Baratin, M., Simon, L., Jorquera, A., Ghigo, C., Dembele, D., Nowak, J., … Bajénoff, M. (2017). T Cell Zone Resident Macrophages Silently Dispose of Apoptotic Cells in the Lymph Node. *Immunity*, *47*(2), 349–362.

Baumann, A., Mateu, E., Murtaugh, M. P., & Summerfield, A. (2013). Impact of genotype 1 and 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses on interferon-α

responses by plasmacytoid dendritic cells. *Veterinary Research*, *44*(1), 33.
Bautista, E. M., & Molitor, T. W. (1997). Cell-Mediated Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine. *Viral Immunology*, *10*(2), 83–94.
Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., … Bureau, F. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(12), 3723–3738.
Benfield, D. A., Nelson, E., Collins, J. E., Harris, L., Goyal, S. M., Robison, D., … Chladek, D. (1992). Characterization of Swine Infertility and Respiratory Syndrome (SIRS) Virus (Isolate ATCC VR-2332). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *4*(2), 127–133.
Bevan, M. J. (1976). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *117*(6), 2233–2238.
Bierk, M. D., Dee, S. A., Rossow, K. D., Otake, S., Collins, J. E., & Molitor, T. W. (2001). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, *65*(4), 261–266.
Bøtner, A., Strandbygaard, B., Sørensen, K. J., Have, P., Madsen, K. G., Madsen, E. S., & Alexandersen, S. (1997). Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *The Veterinary Record*, *141*(19), 497–499.
Brockmeier, S. L., Lager, K. M., Grubman, M. J., Brough, D. E., Ettyreddy, D., Sacco, R. E., … Lehmkuhl, H. D. (2009). Adenovirus-Mediated Expression of Interferon-α Delays Viral Replication and Reduces Disease Signs in Swine Challenged with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viral Immunology*, *22*(3), 173–180.
Brockmeier, S. L., Loving, C. L., Nelson, E. A., Miller, L. C., Nicholson, T. L., Register, K. B., … Kehrli, M. E. (2012). The Presence of Alpha Interferon at the Time of Infection Alters the Innate and Adaptive Immune Responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Clinical and Vaccine Immunology*, *19*(4), 508–514.
Brockmeier, S. L., Palmer, M. V, Bolin, S. R., & Rimler, R. B. (2001). Effects of intranasal inoculation with Bordetella bronchiseptica, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, or a combination of both organisms on subsequent infection with Pasteurella multocida in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, *62*(4), 521–525.
Buddaert, W., Van Reeth, K., & Pensaert, M. (1998). In vivo and in vitro interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *440*, 461–467.
Butler, J. E., Lager, K. M., Golde, W., Faaberg, K. S., Sinkora, M., Loving, C., & Zhang, Y. I. (2014). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. *Immunologic Research*, *59*(1–3), 81–108.
Butler, J. E., Lemke, C. D., Weber, P., Sinkora, M., & Lager, K. M. (2007). Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets: XIX. Undiversified B cells with hydrophobic HCDR3s preferentially proliferate in the porcine reproductive and respiratory syndrome. *Journal of Immunology*, *178*(10), 6320–6331.
Butler, J. E., Wertz, N., & Sinkora, M. (2017). Antibody Repertoire Development in Swine. *Annual Review of Animal Biosciences*, *5*(1), 255–279.
Butler, J. E., Wertz, N., Weber, P., & Lager, K. M. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus subverts repertoire development by proliferation of germline-encoded B cells of all isotypes bearing hydrophobic heavy chain CDR3. *Journal of*

*Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(4), 2347–2356.
Calvert, J. G., Slade, D. E., Shields, S. L., Jolie, R., Mannan, R. M., Ankenbauer, R. G., & Welch, S.-K. W. (2007). CD163 Expression Confers Susceptibility to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *Journal of Virology*, *81*(14), 7371–7379.
Canelli, E., Catella, A., Borghetti, P., Ferrari, L., Ogno, G., De Angelis, E., … Martelli, P. (2017). Phenotypic characterization of a highly pathogenic Italian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) type 1 subtype 1 isolate in experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology*, *210*, 124–133.
Cao, J., Grauwet, K., Vermeulen, B., Devriendt, B., Jiang, P., Favoreel, H., & Nauwynck, H. (2013). Suppression of NK cell-mediated cytotoxicity against PRRSV-infected porcine alveolar macrophages in vitro. *Veterinary Microbiology*, *164*(3), 261–269.
Carlin, L. M., Stamatiades, E. G., Auffray, C., Hanna, R. N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., … Geissmann, F. (2013). Nr4a1-Dependent Ly6Clow Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell*, *153*(2), 362–375.
Carrasco, C. P., Rigden, R. C., Schaffner, R., Gerber, H., Neuhaus, V., Inumaru, S., … Summerfield, A. (2001). Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology*, *104*(2), 175–184.
Carrasco, Y. R., & Batista, F. D. (2007). B Cells Acquire Particulate Antigen in a Macrophage-Rich Area at the Boundary between the Follicle and the Subcapsular Sinus of the Lymph Node. *Immunity*, *27*(1), 160–171.
Cattoretti, G., Chang, C. C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B. H., Falini, B., … Dalla-Favera, R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood*, *86*(1), 45–53.
Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Archives of Virology*, *142*(3), 629–633.
Chamorro, S., Revilla, C., Alvarez, B., Alonso, F., Ezquerra, A., & Dominguez, J. (2005). Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology*, *114*(1), 63–71.
Chamorro, S., Revilla, C., Álvarez, B., López-Fuertes, L., Ezquerra, Á., & Domínguez, J. (2000). Phenotypic Characterization of Monocyte Subpopulations in the Pig. *Immunobiology*, *202*(1), 82–93.
Chand, R. J., Trible, B. R., & Rowland, R. R. (2012). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Current Opinion in Virology*, *2*(3), 256–263.
Chang, H.-C., Peng, Y.-T., Chang, H., Chaung, H.-C., & Chung, W.-B. (2008). Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology*, *129*(3–4), 281–293.
Cheong, C., Matos, I., Choi, J.-H., Dandamudi, D. B., Shrestha, E., Longhi, M. P., … Steinman, R. M. (2010). Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*, *143*(3), 416–429.
Chitko-McKown, C. G., Chapes, S. K., Brown, R. E., Phillips, R. M., McKown, R. D., & Blecha, F. (1991). Porcine alveolar and pulmonary intravascular macrophages: comparison of immune functions. *Journal of Leukocyte Biology*, *50*(4), 364–372.
Christianson, W. T., Choi, C. S., Collins, J. E., Molitor, T. W., Morrison, R. B., & Joo, H. S. (1993). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, *57*(4), 262–268.
Collins, J. E., Benfield, D. A., Christianson, W. T., Harris, L., Hennings, J. C., Shaw, D.

P., … Chladek, D. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *4*(2), 117–126.

Contreras, V., Urien, C., Guiton, R., Alexandre, Y., Vu Manh, T.-P. T.-P., Andrieu, T., … Schwartz-Cornil, I. (2010). Existence of CD8 -Like Dendritic Cells with a Conserved Functional Specialization and a Common Molecular Signature in Distant Mammalian Species. *The Journal of Immunology*, *185*(6), 3313–3325.

Conzelmann, K.-K., Visser, N., Van Woensel, P., & Thiel, H.-J. (1993). Molecular Characterization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, a Member of the Arterivirus Group. *Virology*, *193*(1), 329–339.

Costers, S., Lefebvre, D. J., Goddeeris, B., Delputte, P. L., & Nauwynck, H. J. (2009). Functional impairment of PRRSV-specific peripheral CD3 $^{+}$ CD8 $^{high}$ cells. *Veterinary Research*, *40*(5), 46.

Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., … Dalod, M. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8α + dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(6), 1283–1292.

Dal-Secco, D., Wang, J., Zeng, Z., Kolaczkowska, E., Wong, C. H. Y., Petri, B., … Kubes, P. (2015). A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2 $^{+}$ monocytes at a site of sterile injury. *The Journal of Experimental Medicine*, *212*(4), 447–456.

Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B., & Lawrence, T. (2014). Dendritic cell maturation: Functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO Journal*, *33*(10), 1104–1116.

Das, P. B., Dinh, P. X., Ansari, I. H., de Lima, M., Osorio, F. A., & Pattnaik, A. K. (2010). The Minor Envelope Glycoproteins GP2a and GP4 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Interact with the Receptor CD163. *Journal of Virology*, *84*(4), 1731–1740.

Das, P. B., Vu, H. L. X., Dinh, P. X., Cooney, J. L., Kwon, B., Osorio, F. A., & Pattnaik, A. K. (2011). Glycosylation of minor envelope glycoproteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infectious virus recovery, receptor interaction, and immune response. *Virology*, *410*(2), 385–394.

DeFalco, T., Bhattacharya, I., Williams, A. V, Sams, D. M., & Capel, B. (2014). Yolk-sac-derived macrophages regulate fetal testis vascularization and morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(23), 2384–2393.

Dehring, D. J., & Wismar, B. L. (1989). Intravascular Macrophages in Pulmonary Capillaries of Humans. *American Review of Respiratory Disease*, *139*(4), 1027–1029.

Deloizy, C., Bouguyon, E., Fossum, E., Sebo, P., Osicka, R., Bole, A., … Schwartz-Cornil, I. (2016). Expanding the tools for identifying mononuclear phagocyte subsets in swine: Reagents to porcine CD11c and XCR1. *Developmental & Comparative Immunology*, *65*, 31–40.

Delputte, P. L., Costers, S., & Nauwynck, H. J. (2005). Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *Journal of General Virology*, *86*(5), 1441–1445.

Delputte, P. L., Van Breedam, W., Barbé, F., Van Reeth, K., & Nauwynck, H. J. (2007). IFN-α Treatment Enhances Porcine Arterivirus Infection of Monocytes via Upregulation of the Porcine Arterivirus Receptor Sialoadhesin. *Journal of Interferon & Cytokine*

*Research*, *27*(9), 757–766.
Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., & Staudt, L. M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science*, *276*(5312), 589–592.
Denyer, M. S., Wileman, T. E., Stirling, C. M. A., Zuber, B., & Takamatsu, H.-H. (2006). Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of Natural Killer, Cytotoxic T, Natural Killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *110*(3), 279–292.
Dewey, C., Charbonneau, G., Carman, S., Hamel, A., Nayar, G., Friendship, R., … Swenson, S. (2000). Lelystad-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) identified in Canadian swine. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, *41*(6), 493–494.
Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., & Mateu, E. (2006). Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology*, *351*(2), 249–259.
Doan, D. N. P., & Dokland, T. (2003). Structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Structure*, *11*(11), 1445–1451.
Domogalla, M. P., Rostan, P. V., Raker, V. K., & Steinbrink, K. (2017). Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1764.
Dorner, B. G., Dorner, M. B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., … Kroczek, R. A. (2009). Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells. *Immunity*, *31*(5), 823–833.
Dranoff, G., Crawford, A. D., Sadelain, M., Ream, B., Rashid, A., Bronson, R. T., … Whitsett, J. A. (1994). Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science*, *264*(5159), 713–716.
Duan, X., Nauwynck, H. J., & Pensaert, M. B. (1997a). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Archives of Virology*, *142*(12), 2483–2497.
Duan, X., Nauwynck, H. J., & Pensaert, M. B. (1997b). Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary Microbiology*, *56*(1–2), 9–19.
Durand, M., & Segura, E. (2015). The known unknowns of the human dendritic cell network. *Frontiers in Immunology*, *6*, 129.
Dwivedi, V., Manickam, C., Binjawadagi, B., Linhares, D., Murtaugh, M. P., & Renukaradhya, G. J. (2012). Evaluation of immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs during early stage of infection under farm conditions. *Virology Journal*, *9*(1), 45.
Ebner, F., Rausch, S., Scharek-Tedin, L., Pieper, R., Burwinkel, M., Zentek, J., & Hartmann, S. (2014). A novel lineage transcription factor based analysis reveals differences in T helper cell subpopulation development in infected and intrauterine growth restricted (IUGR) piglets. *Developmental & Comparative Immunology*, *46*(2), 333–340.
Edwards, J. C., Everett, H. E., Pedrera, M., Mokhtar, H., Marchi, E., Soldevila, F., … Graham, S. P. (2017). CD1- and CD1+ porcine blood dendritic cells are enriched for the

orthologues of the two major mammalian conventional subsets. *Scientific Reports*, *7*, 40942.
Eom, D. S., & Parichy, D. M. (2017). A macrophage relay for long-distance signaling during postembryonic tissue remodeling. *Science*, *355*(6331), 1317–1320.
Epelman, S., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. (2014). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, *41*(1), 21–35.
Ezquerra, A., Revilla, C., Alvarez, B., Pérez, C., Alonso, F., & Domínguez, J. (2009). Porcine myelomonocytic markers and cell populations. *Developmental & Comparative Immunology*, *33*(3), 284–298.
Fairbairn, L., Kapetanovic, R., Sester, D. P., & Hume, D. A. (2011). The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *Journal of Leukocyte Biology J. Leukoc. Biol*, *89*, 855–871.
Fang, Y., Kim, D.-Y., Ropp, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., & Rowland, R. R. R. (2004). Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. *Virus Research*, *100*(2), 229–235.
Fang, Y., Treffers, E. E., Li, Y., Tas, A., Sun, Z., van der Meer, Y., … Firth, A. E. (2012). Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(43), 2920–2928.
Ferrari, L., Canelli, E., De Angelis, E., Catella, A., Ferrarini, G., Ogno, G., … Martelli, P. (2018). A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 1 (PRRSV-1) strongly modulates cellular innate and adaptive immune subsets upon experimental infection. *Veterinary Microbiology*, *216*, 85–92.
Firth, A. E., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Wills, N. M., Go, Y. Y., Balasuriya, U. B. R., Atkins, J. F., … Posthuma, C. C. (2011). Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. *The Journal of General Virology*, *92*(Pt 5), 1097–1106.
Flores-Mendoza, L., Silva-Campa, E., Reséndiz, M., Osorio, F. A., & Hernández, J. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clinical and Vaccine Immunology*, *15*(4), 720–725.
Fogg, D. K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D. R., … Geissmann, F. (2006). A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science*, *311*(5757), 83–87.
Forsberg, R., Oleksiewicz, M. B., Krabbe Petersen, A.-M., Hein, J., Bøtner, A., & Storgaard, T. (2001). A Molecular Clock Dates the Common Ancestor of European-type Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus at More Than 10 Years before the Emergence of Disease. *Virology*, *289*(2), 174–179.
Frydas, I. S., Trus, I., Kvisgaard, L. K., Bonckaert, C., Reddy, V. R. A. P., Li, Y., … Nauwynck, H. J. (2015). Different clinical, virological, serological and tissue tropism outcomes of two new and one old Belgian type 1 subtype 1 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates. *Veterinary Research*, *46*(1), 37.
Frydas, I. S., Verbeeck, M., Cao, J., & Nauwynck, H. J. (2013). Replication characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) European subtype 1 (Lelystad) and subtype 3 (Lena) strains in nasal mucosa and cells of the monocytic lineage: indications for the use of new receptors of PRRSV (Lena). *Veterinary Research*, *44*(1), 73.

García-Nicolás, O., Auray, G., Sautter, C. A., Rappe, J. C. F., McCullough, K. C., Ruggli, N., & Summerfield, A. (2016). Sensing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Infected Macrophages by Plasmacytoid Dendritic Cells. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 771.

García-Nicolás, O., Rosales, R. S., Pallarés, F. J., Risco, D., Quereda, J. J., Graham, S. P., … Salguero, F. J. (2015). Comparative analysis of cytokine transcript profiles within mediastinal lymph node compartments of pigs after infection with porcine reproductive and respiratory syndrome genotype 1 strains differing in pathogenicity. *Veterinary Research*, *46*(1), 34.

Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., … Immunological Genome Consortium. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology*, *13*(11), 1118–1128.

Gaya, M., Castello, A., Montaner, B., Rogers, N., Reis e Sousa, C., Bruckbauer, A., & Batista, F. D. (2015). Host response. Inflammation-induced disruption of SCS macrophages impairs B cell responses to secondary infection. *Science*, *347*(6222), 667–672.

Gerner, W., Käser, T., & Saalmüller, A. (2009). Porcine T lymphocytes and NK cells – An update. *Developmental & Comparative Immunology*, *33*(3), 310–320.

Gimeno, M., Darwich, L., Diaz, I., de la Torre, E., Pujols, J., Martín, M., … Mateu, E. (2011). Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Veterinary Research*, *42*(1), 9.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., … Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, *330*(6005), 841–845.

Ginhoux, F., & Guilliams, M. (2016, March 15). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. Cell Press.

Gómez-Laguna, J., Salguero, F. J., Pallarés, F. J., & Carrasco, L. (2013). Immunopathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome in the respiratory tract of pigs. *Veterinary Journal*, *195*(2), 148–155.

Gonzalez, S. F., Lukacs-Kornek, V., Kuligowski, M. P., Pitcher, L. A., Degn, S. E., Kim, Y.-A., … Carroll, M. C. (2010). Capture of influenza by medullary dendritic cells via SIGN-R1 is essential for humoral immunity in draining lymph nodes. *Nature Immunology*, *11*(5), 427–434.

Gorbalenya, A. E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., & Snijder, E. J. (2006). Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. *Virus Research*, *117*(1), 17–37.

Gosselin, D., Link, V. M., Romanoski, C. E., Fonseca, G. J., Eichenfield, D. Z., Spann, N. J., … Glass, C. K. (2014). Environment Drives Selection and Function of Enhancers Controlling Tissue-Specific Macrophage Identities. *Cell*, *159*(6), 1327–1340.

Granot, T., Senda, T., Carpenter, D. J., Matsuoka, N., Weiner, J., Gordon, C. L., … Farber, D. L. (2017). Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity*, *46*(3), 504–515.

Gray, E. E., & Cyster, J. G. (2012). Lymph Node Macrophages. *Journal of Innate Immunity*, *4*(5–6), 424–436.

Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., … Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of Experimental*

*Medicine*, *210*(10), 1977–1992.
Guilliams, M., Dutertre, C.-A., Scott, C. L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., … Ginhoux, F. (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*, *45*(3), 669–684.
Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., … Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*, *14*(8), 571–578.
Guilliams, M., Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2013). Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal Immunology*, *6*(3), 464–473.
Guilliams, M., & van de Laar, L. (2015). A Hitchhiker's Guide to Myeloid Cell Subsets: Practical Implementation of a Novel Mononuclear Phagocyte Classification System. *Frontiers in Immunology*, *6*, 406.
Guo, B., Lager, K. M., Henningson, J. N., Miller, L. C., Schlink, S. N., Kappes, M. A., … Faaberg, K. S. (2013). Experimental infection of United States swine with a Chinese highly pathogenic strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, *435*(2), 372–384.
Guo, R., Katz, B. B., Tomich, J. M., Gallagher, T., & Fang, Y. (2016). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus utilizes nanotubes for intercellular spread. *Journal of Virology*, *90*(10), 5163–5175.
Guzylack-Piriou, L., Alves, M. P., McCullough, K. C., & Summerfield, A. (2010). Porcine Flt3 ligand and its receptor: generation of dendritic cells and identification of a new marker for porcine dendritic cells. *Developmental and Comparative Immunology*, *34*(4), 455–464.
Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., & Gojobori, T. (2005). The Origin and Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *Molecular Biology and Evolution*, *22*(4), 1024–1031.
Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., … Merad, M. (2013). Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity*, *38*(4), 792–804.
Heesters, B. A., Chatterjee, P., Kim, Y.-A., Gonzalez, S. F., Kuligowski, M. P., Kirchhausen, T., & Carroll, M. C. (2013). Endocytosis and Recycling of Immune Complexes by Follicular Dendritic Cells Enhances B Cell Antigen Binding and Activation. *Immunity*, *38*(6), 1164–1175.
Heesters, B. A., Myers, R. C., & Carroll, M. C. (2014). Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nature Reviews Immunology*, *14*(7), 495–504.
Heesters, B. A., van der Poel, C. E., Das, A., & Carroll, M. C. (2016). Antigen Presentation to B Cells. *Trends in Immunology*, *37*(12), 844–854.
Helft, J., Böttcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B. U., … Reis e Sousa, C. (2015). GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*, *42*(6), 1197–1211.
Hermann, J. R., Muñoz-Zanzi, C. A., Roof, M. B., Burkhart, K., & Zimmerman, J. J. (2005). Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. *Veterinary Microbiology*, *110*(1–2), 7–16.
Hettinger, J., Richards, D. M., Hansson, J., Barra, M. M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., & Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology*, *14*(8), 821–830.

Hoffmann, P., Skibinski, G., & James, K. (1995). Organ culture of human lymphoid tissue. I. Characteristics of the system. *Journal of Immunological Methods*, *179*(1), 37–49.
Ingersoll, M. A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E. L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., … Randolph, G. J. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*, *115*(3), e10-9.
Jiang, P., Chen, P. Y., Dong, Y. Y., Cai, J. L., Cai, B. X., & Jiang, Z. H. (2000). Isolation and genome characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in P.R. China. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, *12*(2), 156–158.
Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*.
Johnson, C. R., Griggs, T. F., Gnanandarajah, J., & Murtaugh, M. P. (2011). Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses. *The Journal of General Virology*, *92*(Pt 5), 1107–1116.
Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., Christopher-Hennings, J., Johnson, C. R., & Murtaugh, M. P. (2004). Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *102*(3), 233–247.
Junt, T., Moseman, E. A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P. A., Boes, M., … von Andrian, U. H. (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature*, *450*(7166), 110–114.
Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B. S., … Nutt, S. L. (2007). Initiation of Plasma-Cell Differentiation Is Independent of the Transcription Factor Blimp-1. *Immunity*, *26*(5), 555–566.
Kappes, M. A., & Faaberg, K. S. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*, *479–480*, 475–486.
Kapur, V., Elam, M. R., Pawlovich, T. M., & Murtaugh, M. P. (1996). Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *The Journal of General Virology*, *77 ( Pt 6)*(6), 1271–1276.
Karniychuk, U. U., Geldhof, M., Vanhee, M., Doorsselaere, J. VAN, Saveleva, T. A., & Nauwynck, H. J. (2010). Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Veterinary Research*, *6*(1), 30.
Käser, T., Gerner, W., Hammer, S. E., Patzl, M., & Saalmüller, A. (2008a). Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *125*(1–2), 92–101.
Käser, T., Gerner, W., Hammer, S. E., Patzl, M., & Saalmüller, A. (2008b). Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4+CD25high regulatory T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *122*(1–2), 153–158.
Keffaber, K.K. (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsletter*, *1*, 1_10.
Kim, J.-K., Fahad, A.-M., Shanmukhappa, K., & Kapil, S. (2006). Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10. *Journal of Virology*, *80*(2), 689–696.
Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., … Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature Immunology*, *7*(7), 773–782.
Klein, U., & Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and

malignancy. *Nature Reviews Immunology*, *8*(1), 22–33.
Koyama, S., Ishii, K. J., Coban, C., & Akira, S. (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine*, *43*(3), 336–341.
Kretzschmar, K., & Watt, F. M. (2012). Lineage tracing. *Cell*, *148*(1–2), 33–45.
Kuhn, J. H., Lauck, M., Bailey, A. L., Shchetinin, A. M., Vishnevskaya, T. V., Bào, Y., … Goldberg, T. L. (2016). Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. *Archives of Virology*, *161*(3), 755–768.
Kuraoka, M., Schmidt, A. G., Nojima, T., Feng, F., Watanabe, A., Kitamura, D., … Kelsoe, G. (2016). Complex Antigens Drive Permissive Clonal Selection in Germinal Centers. *Immunity*, *44*(3), 542–552.
Lauber, C., Goeman, J. J., de Parquet, M. C., Thi Nga, P., Snijder, E. J., Morita, K., & Gorbalenya, A. E. (2013). The Footprint of Genome Architecture in the Largest Genome Expansion in RNA Viruses. *PLoS Pathogens*, *9*(7), e1003500.
Lauring, A. S., & Andino, R. (2010). Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLoS Pathogens*, *6*(7), e1001005.
Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., … Amit, I. (2014). Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell*, *159*(6), 1312–1326.
Lee, C. K., Rao, D. T., Gertner, R., Gimeno, R., Frey, A. B., & Levy, D. E. (2000). Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *Journal of Immunology*, *165*(7), 3571–3577.
Lee, C., Kim, H., Kang, B., Yeom, M., Han, S., Moon, H., … Park, B. (2010). Prevalence and phylogenetic analysis of the isolated type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2007 to 2008 in Korea. *Virus Genes*, *40*(2), 225–230.
Lee, C., & Yoo, D. (2006). The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology*, *355*(1), 30–43.
Lee, J., Choi, K., Olin, M. R., Cho, S.-N., & Molitor, T. W. (2004). Gammadelta T cells in immunity induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin vaccination. *Infection and Immunity*, *72*(3), 1504–1511.
Lemke, C. D., Haynes, J. S., Spaete, R., Adolphson, D., Vorwald, A., Lager, K., & Butler, J. E. (2004). Lymphoid hyperplasia resulting in immune dysregulation is caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs. *Journal of Immunology*, *172*(3), 1916–1925.
Li, Y., Treffers, E. E., Napthine, S., Tas, A., Zhu, L., Sun, Z., … Fang, Y. (2014). Transactivation of programmed ribosomal frameshifting by a viral protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(21), E2172–E2181.
Liang, S. C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., & Fouser, L. A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of Experimental Medicine*, *203*(10), 2271–2279.
Liu, J., Wei, S., Liu, L., Shan, F., Zhao, Y., & Shen, G. (2016). The role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in immune phenotype and Th1/Th2 balance of dendritic cells. *Developmental & Comparative Immunology*, *65*, 245–252.
Liu, J., Xue, Y., Dong, D., Xiao, C., Lin, C., Wang, H., … Li, Z. (2017). CCR2− and CCR2+ corneal macrophages exhibit distinct characteristics and balance inflammatory responses after epithelial abrasion. *Mucosal Immunology*, *10*(5), 1145–1159.

Liu, Y.-J. (2005). IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annual Review of Immunology*, *23*(1), 275–306.

Lopez, O. J., Oliveira, M. F., Garcia, E. A., Kwon, B. J., Doster, A., & Osorio, F. A. (2007). Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, *14*(3), 269–275.

Loving, C. L., Brockmeier, S. L., & Sacco, R. E. (2007). Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology*, *120*(2), 217–229.

Loving, C. L., Osorio, F. A., Murtaugh, M. P., & Zuckermann, F. A. (2015). Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *167*(1–2), 1–14.

Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., & Renukaradhya, G. J. (2016). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual Review of Animal Biosciences*, *4*(1), 129–154.

Madsen, K. G., Hansen, C. M., Madsen, E. S., Strandbygaard, B., Bøtner, A., & Sørensen, K. J. (1998). Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Archives of Virology*, *143*(9), 1683–1700.

Mair, K. H., Sedlak, C., Käser, T., Pasternak, A., Levast, B., Gerner, W., … Meurens, F. (2014). The porcine innate immune system: An update. *Developmental & Comparative Immunology*, *45*(2), 321–343.

Maisonnasse, P., Bouguyon, E., Piton, G., Ezquerra, A., Urien, C., Deloizy, C., … Bertho, N. (2016). The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. *Mucosal Immunology*, *9*(4), 835–849.

Malur, A., Baker, A. D., Mccoy, A. J., Wells, G., Barna, B. P., Kavuru, M. S., … Thomassen, M. J. (2011). Restoration of PPARγ reverses lipid accumulation in alveolar macrophages of GM-CSF knockout mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *300*(1), 73–80.

Marquet, F., Bonneau, M., Pascale, F., Urien, C., Kang, C., Schwartz-Cornil, I., & Bertho, N. (2011). Characterization of Dendritic Cells Subpopulations in Skin and Afferent Lymph in the Swine Model. *PLoS ONE*, *6*(1), e16320.

Marquet, F., Vu Manh, T.-P., Maisonnasse, P., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Bouguyon, E., … Bertho, N. (2014). Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *193*(12), 5883–5893.

Martelli, P., Gozio, S., Ferrari, L., Rosina, S., De Angelis, E., Quintavalla, C., … Borghetti, P. (2009). Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: Clinical protection and cell-mediated immunity. *Vaccine*, *27*(28), 3788–3799.

Martinez, F. O., Helming, L., Milde, R., Varin, A., Melgert, B. N., Draijer, C., … Gordon, S. (2013). Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*, *121*(9), e57–e69.

Mateu, E., & Diaz, I. (2008). The challenge of PRRS immunology. *The Veterinary Journal*, *177*(3), 345–351.

McCullough, K. C., Schaffner, R., Natale, V., Kim, Y. B., & Summerfield, A. (1997). Phenotype of porcine monocytic cells: modulation of surface molecule expression upon monocyte differentiation into macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *58*(3–4), 265–275.

McFarlin, D. E., & Binns, R. M. (1973). Lymph node function and lymphocyte circulation in the pig. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *29*(0), 87–93.

Meier, W. A., Galeota, J., Osorio, F. A., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M., & Zuckermann, F. A. (2003). Gradual development of the interferon-γ response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology*, *309*(1), 18–31.

Meng, X. J., Paul, P. S., Halbur, P. G., & Lum, M. A. (1995). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Archives of Virology*, *140*(4), 745–755.

Merad, M., Manz, M. G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., … Engleman, E. G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature Immunology*, *3*(12), 1135–1141.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology*, *31*(1), 563–604.

Meulenberg, J. J. M., de Meijer, E. J., & Moormann, R. J. M. (1993). Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *Journal of General Virology*, *74*(8), 1697–1701.

Meulenberg, J. J. M., Hulst, M. M., de Meijer, E. J., Moonen, P. L. J. M., den Besten, A., de Kluyver, E. P., … Moormann, R. J. M. (1993). Lelystad Virus, the Causative Agent of Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS), Is Related to LDV and EAV. *Virology*, *192*(1), 62–72.

Meulenberg, J. J., Petersen-den Besten, A., De Kluyver, E. P., Moormann, R. J., Schaaper, W. M., & Wensvoort, G. (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology*, *206*(1), 155–163.

Michaelson, M. D., Bieri, P. L., Mehler, M. F., Xu, H., Arezzo, J. C., Pollard, J. W., & Kessler, J. A. (1996). CSF-1 deficiency in mice results in abnormal brain development. *Development*, *122*(9), 2661–2672.

Mokhtar, H., Eck, M., Morgan, S. B., Essler, S. E., Frossard, J.-P., Ruggli, N., & Graham, S. P. (2014). Proteome-wide screening of the European porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals a broad range of T cell antigen reactivity. *Vaccine*, *32*(50), 6828–6837.

Mokhtar, H., Pedrera, M., Frossard, J.-P., Biffar, L., Hammer, S. E., Kvisgaard, L. K., … Graham, S. P. (2016). The Non-structural Protein 5 and Matrix Protein Are Antigenic Targets of T Cell Immunity to Genotype 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *Frontiers in Immunology*, *7*, 40.

Molawi, K., Wolf, Y., Kandalla, P. K., Favret, J., Hagemeyer, N., Frenzel, K., … Sieweke, M. H. (2014). Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(11), 2151–2158.

Morgan, S. B. B., Graham, S. P. P., Salguero, F. J. J., Sánchez Cordón, P. J. J., Mokhtar, H., Rebel, J. M. J. M. J., … Frossard, J. P. P. (2013). Increased pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance. *Veterinary Microbiology*, *163*(1–2), 13–22.

Murphy, T. L., Grajales-Reyes, G. E., Wu, X., Tussiwand, R., Briseño, C. G., Iwata, A., … Murphy, K. M. (2016). Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. *Annual Review of Immunology*, *34*(1), 93–119.

Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., … Wynn, T. A. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, *41*(1), 14–20.

Murtaugh, M. P., Johnson, C. R., Xiao, Z., Scamurra, R. W., & Zhou, Y. (2009). Species specialization in cytokine biology: is interleukin-4 central to the T(H)1-T(H)2 paradigm in swine? *Developmental and Comparative Immunology*, *33*(3), 344–352.

Naik, S. H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A. I., Dakic, A., … Shortman, K. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nature Immunology*, *8*(11), 1217–1226.

Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annual Review of Immunology*, *32*, 367–402.

Neuhaus, V., Schaudien, D., Golovina, T., Temann, U.-A., Thompson, C., Lippmann, T., … Braun, A. (2017). Assessment of long-term cultivated human precision-cut lung slices as an ex vivo system for evaluation of chronic cytotoxicity and functionality. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, *12*, 13.

Nieuwenhuis, N., Duinhof, T. F., & van Nes, A. (2012). Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *The Veterinary Record*, *170*(9), 225.

Onai, N., Kurabayashi, K., Hosoi-Amaike, M., Toyama-Sorimachi, N., Matsushima, K., Inaba, K., & Ohteki, T. (2013). A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential. *Immunity*, *38*(5), 943–957.

Osorio, F. A., Galeota, J. A., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., … Laegreid, W. W. (2002). Passive Transfer of Virus-Specific Antibodies Confers Protection against Reproductive Failure Induced by a Virulent Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Establishes Sterilizing Immunity. *Virology*, *302*(1), 9–20.

Ostrowski, M., Galeota, J. A., Jar, A. M., Platt, K. B., Osorio, F. A., & Lopez, O. J. (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *Journal of Virology*, *76*(9), 4241–4250.

Overend, C., Mitchell, R., He, D., Rompato, G., Grubman, M. J., & Garmendia, A. E. (2007). Recombinant swine beta interferon protects swine alveolar macrophages and MARC-145 cells from infection with Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*, *88*(3), 925–931.

Park, C.-S., & Choi, Y. S. (2005). How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology*, *114*(1), 2–10.

Pasternak, A. O., Spaan, W. J. M., & Snijder, E. J. (2006). Nidovirus transcription: how to make sense...? *Journal of General Virology*, *87*(6), 1403–1421.

Pastoret Paul-Pierre, Griebel Philip, Bazin Hervé, A. G. (1998). *Handbook of vertebrate immunology*. Academic Press.

Pastva, A. M., Wright, J. R., & Williams, K. L. (2007). Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *4*(3), 252–257.

Perdiguero, E. G., & Geissmann, F. (2016). The development and maintenance of resident macrophages. *Nature Immunology*, *17*(1), 2–8.

Phan, T. G., Gray, E. E., & Cyster, J. G. (2009). The microanatomy of B cell activation. *Current Opinion in Immunology*, *21*(3), 258–265.

Phan, T. G., Green, J. A., Gray, E. E., Xu, Y., & Cyster, J. G. (2009). Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. *Nature Immunology*, *10*(7), 786–793.

Pileri, E., & Mateu, E. (2016). Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Veterinary Research*, *47*.

Pilon, C., Levast, B., Meurens, F., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Salmon, H., … Baron, C. (2009). CD40 engagement strongly induces CD25 expression on porcine dendritic cells and polarizes the T cell immune response toward Th1. *Molecular Immunology*, *46*(3), 437–447.

Pintarič, M., Gerner, W., & Saalmüller, A. (2008). Synergistic effects of IL-2, IL-12 and IL-18 on cytolytic activity, perforin expression and IFN-γ production of porcine natural killer cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *121*(1–2), 68–82.

Prather, R. S., Rowland, R. R. R., Ewen, C., Trible, B., Kerrigan, M., Bawa, B., … Green, J. A. (2013). An Intact Sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) Is Not Required for Attachment/Internalization of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Virology*, *87*(17), 9538–9546.

Pröll, M. J., Neuhoff, C., Schellander, K., Uddin, M. J., Cinar, M. U., Sahadevan, S., … Große-Brinkhaus, C. (2017). Transcriptome profile of lung dendritic cells after in vitro porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *PLOS ONE*, *12*(11), e0187735.

Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., … Palucka, K. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *165*(1), 566–572.

Rae, F., Woods, K., Sasmono, T., Campanale, N., Taylor, D., Ovchinnikov, D. A., … Little, M. H. (2007). Characterisation and trophic functions of murine embryonic macrophages based upon the use of a Csf1r–EGFP transgene reporter. *Developmental Biology*, *308*(1), 232–246.

Rahe, M., & Murtaugh, M. (2017). Mechanisms of Adaptive Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viruses*, *9*(6), 148.

Reimold, A. M., Iwakoshi, N. N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallese, E. M., … Glimcher, L. H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, *412*(6844), 300–307.

Renson, P., Rose, N., Le Dimna, M., Mahé, S., Keranflec'h, A., Paboeuf, F., … Bourry, O. (2017). Dynamic changes in bronchoalveolar macrophages and cytokines during infection of pigs with a highly or low pathogenic genotype 1 PRRSV strain. *Veterinary Research*, *48*(1), 15.

Renukaradhya, G. J., Alekseev, K., Jung, K., Fang, Y., & Saif, L. J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced immunosuppression exacerbates the inflammatory response to porcine respiratory coronavirus in pigs. *Viral Immunology*, *23*(5), 457–466.

Riffault, S., Carrat, C., Besnardeau, L., La Bonnardière, C., & Charley, B. (1997). In vivo induction of interferon-alpha in pig by non-infectious coronavirus: tissue localization and in situ phenotypic characterization of interferon-alpha-producing cells. *The Journal of General Virology*, *78 ( Pt 10*(10), 2483–2487.

Rizza, P., Moretti, F., & Capone, I. (2015). Role of type I interferon in inducing a protective immune response: Perspectives for clinical applications. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *26*(2), 195–201.

Robbins, S. H., Walzer, T., Dembélé, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., … Dalod, M. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biology*, *9*(1), R17.

Robinson, S. R., Li, J., Nelson, E. A., & Murtaugh, M. P. (2015). Broadly neutralizing antibodies against the rapidly evolving porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research*, *203*, 56–65.

Robinson, S. R., Rahe, M. C., Gray, D. K., Martins, K. V., & Murtaugh, M. P. (2018). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus neutralizing antibodies provide in vivo cross-protection to PRRSV1 and PRRSV2 viral challenge. *Virus Research*, *248*, 13–23.

Ropp, S. L., Wees, C. E. M., Fang, Y., Nelson, E. A., Rossow, K. D., Bien, M., … Faaberg, K. S. (2004). Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *Journal of Virology*, *78*(7), 3684–3703.

Rowland, R. R. R., Steffen, M., Ackerman, T., & Benfield, D. A. (1999). The Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Quasispecies and Emergence of a Virus Subpopulation during Infection of Pigs with VR-2332. *Virology*, *259*(2), 262–266.

Saalmüller, A., Pauly, T., Höhlich, B.-J., & Pfaff, E. (1999). Characterization of porcine T lymphocytes and their immune response against viral antigens. *Journal of Biotechnology*, *73*(2–3), 223–233.

Salguero, F. J., Frossard, J.-P., Rebel, J. M. J., Stadejek, T., Morgan, S. B., Graham, S. P., & Steinbach, F. (2015). Host–pathogen interactions during porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection of piglets. *Virus Research*, *202*, 135–143.

Satpathy, A. T., Wu, X., Albring, J. C., & Murphy, K. M. (2012). Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nature Immunology*, *13*(12), 1145–1154.

Saunderson, S. C., Dunn, A. C., Crocker, P. R., & McLellan, A. D. (2014). CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood*, *123*(2), 208–216.

Scheeren, F. A., Naspetti, M., Diehl, S., Schotte, R., Nagasawa, M., Wijnands, E., … Spits, H. (2005). STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nature Immunology*, *6*(3), 303–313.

Schmidl, C., Renner, K., Peter, K., Eder, R., Lassmann, T., Balwierz, P. J., … FANTOM consortium. (2014). Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets. *Blood*, *123*(17), e90–e99.

Schneberger, D., Aharonson-Raz, K., & Singh, B. (2012). Pulmonary intravascular macrophages and lung health: What are we missing? *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *302*(6), 498–503.

Schommer, S. K., & Kleiboeker, S. B. (2006). Use of a PRRSV infectious clone to evaluate in vitro quasispecies evolution. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 581, pp. 435–438). Springer, Boston, MA.

Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., … Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, *336*(6077), 86–90.

Shaffer, A. L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E. P., & Staudt, L. M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle

control. *Immunity*, *13*(2), 199–212.
Shanmukhappa, K., Kim, J.-K., & Kapil, S. (2007). Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology Journal*, *4*(1), 62.
Shi, M., Lam, T. T.-Y., Hon, C.-C., Hui, R. K.-H., Faaberg, K. S., Wennblom, T., … Leung, F. C.-C. (2010). Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Virus Research*, *154*(1–2), 7–17.
Sichien, D., Scott, C. L., Martens, L., Vanderkerken, M., Van Gassen, S., Plantinga, M., … Guilliams, M. (2016). IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. *Immunity*, *45*(3), 626–640.
Silva-Campa, E., Cordoba, L., Fraile, L., Flores-Mendoza, L., Montoya, M., & Hernández, J. (2010). European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. *Virology*, *396*(2), 264–271.
Silva-Campa, E., Flores-Mendoza, L., Reséndiz, M., Pinelli-Saavedra, A., Mata-Haro, V., Mwangi, W., & Hernández, J. (2009). Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, *387*(2), 373–379.
Singleton, H., Graham, S. P., Bodman-Smith, K. B., Frossard, J.-P., & Steinbach, F. (2016). Establishing Porcine Monocyte-Derived Macrophage and Dendritic Cell Systems for Studying the Interaction with PRRSV-1. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 832.
Sinkora, M., Butler, J. E., Lager, K. M., Potockova, H., & Sinkorova, J. (2014). The comparative profile of lymphoid cells and the T and B cell spectratype of germ-free piglets infected with viruses SIV, PRRSV or PCV2. *Veterinary Research*, *45*(1), 91.
Sinkora, M., & Sinkorova, J. (2014). B Cell Lymphogenesis in Swine Is Located in the Bone Marrow. *The Journal of Immunology*, *193*(10), 5023–5032.
Sinkora, M., Stepanova, K., Butler, J. E., Francis, D., Santiago-Mateo, K., Potockova, H., … Sinkorova, J. (2011). Ileal Peyer's Patches Are Not Necessary for Systemic B Cell Development and Maintenance and Do Not Contribute Significantly to the Overall B Cell Pool in Swine. *The Journal of Immunology*, *187*(10), 5150–5161.
Sinkora, M., Stepanova, K., & Sinkorova, J. (2013). Different anti-CD21 antibodies can be used to discriminate developmentally and functionally different subsets of B lymphocytes in circulation of pigs. *Developmental & Comparative Immunology*, *39*(4), 409–418.
Snijder, E. J., Dobbe, J. C., & Spaan, W. J. M. (2003). Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. *Journal of Virology*, *77*(1), 97–104.
Snijder, E. J., Kikkert, M., & Fang, Y. (2013). Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *The Journal of General Virology*, *94*(Pt 10), 2141–2163.
Spilman, M. S., Welbon, C., Nelson, E., & Dokland, T. (2009). Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid. *Journal of General Virology*, *90*(3), 527–535.
Stadejek, T., Oleksiewicz, M. B., Potapchuk, D., & Podgórska, K. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *The Journal of General Virology*, *87*(Pt 7), 1835–1841.
Stadejek, T., Oleksiewicz, M. B., Scherbakov, A. V., Timina, A. M., Krabbe, J. S., Chabros, K., & Potapchuk, D. (2008). Definition of subtypes in the European genotype of porcine

reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Archives of Virology*, *153*(8), 1479–1488.
Stadejek, T., Stankevicius, A., Murtaugh, M. P., & Oleksiewicz, M. B. (2013). Molecular evolution of PRRSV in Europe: Current state of play. *Veterinary Microbiology*, *165*(1–2), 21–28.
Stadejek, T., Stankevicius, A., Storgaard, T., Oleksiewicz, M. B., Belák, S., Drew, T. W., & Pejsak, Z. (2002). Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *The Journal of General Virology*, *83*(Pt 8), 1861–1873.
Stefater, J. A., Ren, S., Lang, R. A., & Duffield, J. S. (2011). Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends in Molecular Medicine*, *17*(12), 743–752.
Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of Experimental Medicine*, *137*(5), 1142–1162.
Steinman, R. M., & Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *75*(10), 5132–5136.
Stockwin, L. H., McGonagle, D., Martin, I. G., & Blair, G. E. (2000). Dendritic cells: Immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunology and Cell Biology*, *78*(2), 91–102.
Suárez, P., Zardoya, R., Martín, M. J., Prieto, C., Dopazo, J., Solana, A., & Castro, J. M. (1996). Phylogenetic relationships of european strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Research*, *42*(1–2), 159–165.
Summerfield, A., Guzylack-Piriou, L., Schaub, A., Carrasco, C. P., Tâche, V., Charley, B., & McCullough, K. C. (2003). Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. *Immunology*, *110*(4), 440–449.
Summerfield, A., & McCullough, K. C. (2009). The porcine dendritic cell family. *Developmental and Comparative Immunology*, *33*(3), 299–309.
Swenson, S. L., Hill, H. T., Zimmerman, J. J., Evans, L. E., Landgraf, J. G., Wills, R. W., … Ciszewski, D. K. (1994). Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *204*(12), 1943–1948.
Takamatsu, H.-H., Denyer, M. ., & Wileman, T. . (2002). A sub-population of circulating porcine γδ T cells can act as professional antigen presenting cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *87*(3–4), 223–224.
Tas, J. M. J., Mesin, L., Pasqual, G., Targ, S., Jacobsen, J. T., Mano, Y. M., … Victora, G. D. (2016). Visualizing antibody affinity maturation in germinal centers. *Science*, *351*(6277), 1048–1054.
Terpstra, C. ., Wensvoort, G. ., & Pol, J. M. A. . (1991). Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad vims: Koch's postulates fulfilled. *Veterinary Quarterly*, *13*(3), 131–136.
Thacker, E. L., Halbur, P. G., Ross, R. F., Thanawongnuwech, R., & Thacker, B. J. (1999). Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(3), 620–627.
Thaiss, C. A., Semmling, V., Franken, L., Wagner, H., & Kurts, C. (2011). Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation. *Frontiers in Immunology*, *2*, 31.

Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A., & Damrongwatanapokin, S. (2004). Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Veterinary Microbiology*, *101*(1), 9–21.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P. G., & Thacker, E. L. (2000). The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Animal Health Research Reviews*, *1*(2), 95–102.

Tian, D., Wei, Z., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Liu, R., Tong, G., Snijder, E. J., & Yuan, S. (2012). Arterivirus Minor Envelope Proteins Are a Major Determinant of Viral Tropism in Cell Culture. *Journal of Virology*, *86*(7), 3701–3712.

Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., … Gao, G. F. (2007). Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark. *PLoS ONE*, *2*(6), e526.

Trible, B. R., Popescu, L. N., Monday, N., Calvert, J. G., & Rowland, R. R. R. (2015). A single amino acid deletion in the matrix protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus confers resistance to a polyclonal swine antibody with broadly neutralizing activity. *Journal of Virology*, *89*(12), 6515–6520.

Turner, C. A., Mack, D. H., & Davis, M. M. (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell*, *77*(2), 297–306.

Ulferts, R., & Ziebuhr, J. (2011). Nidovirus ribonucleases: Structures and functions in viral replication. *RNA Biology*, *8*(2), 295–304.

Van Breedam, W., Delputte, P. L., Van Gorp, H., Misinzo, G., Vanderheijden, N., Duan, X., & Nauwynck, H. J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *The Journal of General Virology*, *91*(Pt 7), 1659–1667.

Van Breedam, W., Van Gorp, H., Zhang, J. Q., Crocker, P. R., Delputte, P. L., & Nauwynck, H. J. (2010). The M/GP5 glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathogens*, *6*(1), e1000730.

van der Linden, I. F. A., Voermans, J. J. M., van der Linde-Bril, E. M., Bianchi, A. T. J., & Steverink, P. J. G. M. (2003). Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. *Vaccine*, *21*(17–18), 1952–1957.

van Dinten, L. C., Wassenaar, A. L., Gorbalenya, A. E., Spaan, W. J., & Snijder, E. J. (1996). Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains. *Journal of Virology*, *70*(10), 6625–6633.

van Furth, R., & Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, *128*(3), 415–435.

Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P. L., & Nauwynck, H. J. (2009). The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163-positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection. *Archives of Virology*, *154*(12), 1939–1943.

Van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H., & Pensaert, M. (1999). Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: Correlations with pathogenicity. *Research in Veterinary Science*, *67*(1), 47–52.

Verheije, M. H., Welting, T. J. M., Jansen, H. T., Rottier, P. J. M., & Meulenberg, J. J. M. (2002). Chimeric arteriviruses generated by swapping of the M protein ectodomain rule

out a role of this domain in viral targeting. *Virology*, *303*(2), 364–373.
Vu Manh, T.-P., Bertho, N., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., & Dalod, M. (2015). Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions. *Frontiers in Immunology*, *6*, 260.
Vu Manh, T.-P., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Ruscanu, S., Jouneau, L., Bourge, M., … Schwartz-Cornil, I. (2015). Defining Mononuclear Phagocyte Subset Homology Across Several Distant Warm-Blooded Vertebrates Through Comparative Transcriptomics. *Frontiers in Immunology*, *6*(June), 1–26.
Vu Manh, T.-P., Marty, H., Sibille, P., Le Vern, Y., Kaspers, B., Dalod, M., … Quéré, P. (2014). Existence of conventional dendritic cells in Gallus gallus revealed by comparative gene expression profiling. *Journal of Immunology*, *192*(10), 4510–4517.
Wagstrom, E. A., Chang, C. C., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. J. (2001). Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. *American Journal of Veterinary Research*, *62*(12), 1876–1880.
Wang, G., He, Y., Tu, Y., Liu, Y., Zhou, E.-M., Han, Z., … Cai, X. (2014). Comparative analysis of apoptotic changes in peripheral immune organs and lungs following experimental infection of piglets with highly pathogenic and classical porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology Journal*, *11*, 2.
Wang, T., Fang, L., Zhao, F., Wang, D., & Xiao, S. (2017). Exosomes mediate intercellular transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Journal of Virology*, *92*(4), JVI.01734-17.
Wang, X., Eaton, M., Mayer, M., Li, H., He, D., Nelson, E., & Christopher-Hennings, J. (2007). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Archives of Virology*, *152*(2), 289–303.
Weesendorp, E., Morgan, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Graaf, D. J. P.-D., Graham, S. P., & Rebel, J. M. J. (2013). Comparative analysis of immune responses following experimental infection of pigs with European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of differing virulence. *Veterinary Microbiology*, *163*(1–2), 1–12.
Weesendorp, E., Stockhofe-Zurwieden, N., Popma-De Graaf, D. J., Fijten, H., & Rebel, J. M. J. (2013). Phenotypic modulation and cytokine profiles of antigen presenting cells by European subtype 1 and 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in vitro and in vivo. *Veterinary Microbiology*, *167*(3–4), 638–650.
Wells, K. D., Bardot, R., Whitworth, K. M., Trible, B. R., Fang, Y., Mileham, A., … Rowland, R. R. R. (2017). Replacement of Porcine CD163 Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 with a CD163-Like Homolog Confers Resistance of Pigs to Genotype 1 but Not Genotype 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Virology*, *91*(2), e01521-16.
Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J. M. A., ter Laak, E. A., Bloemraad, M., de Kluyver, E. P., … Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly*, *13*(3), 121–130.
Wills, R. W., Doster, A. R., Galeota, J. A., Sur, J.-H., & Osorio, F. A. (2003). Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(1), 58–62.
Wills, R. W., Zimmerman, J. J., Yoon, K.-J., Swenson, S. L., Hoffman, L. J., McGinley, M. J., … Platt, K. B. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Veterinary Microbiology*, *57*(1), 69–81.
Wissink, E. H. J., Kroese, M. V, van Wijk, H. A. R., Rijsewijk, F. A. M., Meulenberg, J. J.

M., & Rottier, P. J. M. (2005). Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virology*, *79*(19), 12495–12506.

Wu, W.-H., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, R. R. ., Christopher-Hennings, J., & Nelson, E. A. (2001). A 10-kDa Structural Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Encoded by ORF2b. *Virology*, *287*(1), 183–191.

Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., & Murtaugh, M. P. (2004). The Level of Virus-Specific T-Cell and Macrophage Recruitment in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection in Pigs Is Independent of Virus Load. *Journal of Virology*, *78*(11), 5923–5933.

Xie, J., Christiaens, I., Yang, B., Breedam, W. Van, Cui, T., & Nauwynck, H. J. (2017). Molecular cloning of porcine Siglec-3, Siglec-5 and Siglec-10, and identification of Siglec-10 as an alternative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Journal of General Virology*, *98*(8), 2030–2042.

Yang, H., & Parkhouse, R. M. (1996). Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology*, *89*(1), 76–83.

Yang, H., & Parkhouse, R. M. (1997). Differential expression of CD8 epitopes amongst porcine CD8-positive functional lymphocyte subsets. *Immunology*, *92*(1), 45–52.

Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., Waard, R. de, … Dalla-Favera, R. (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nature Genetics*, *16*(2), 161–170.

Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., … Jung, S. (2013). Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*, *38*(1), 79–91.

Yoon, I. J., Joo, H. S., Goyal, S. M., & Molitor, T. W. (1994). A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, *6*(3), 289–292.

Yoon, K.-J., Wu, L.-L., Zimmerman, J. J., Hill, H. T., & Platt, K. B. (1996). Antibody-Dependent Enhancement (ADE) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Infection in Pigs. *Viral Immunology*, *9*(1), 51–63.

Yoon, K. J., Zimmerman, J. J., Chang, C. C., Cancel-Tirado, S., Harmon, K. M., & McGinley, M. J. (1999). Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. *Veterinary Research*, *30*(6), 629–638.

Zhang, H., Guo, X., Nelson, E., Christopher-Hennings, J., & Wang, X. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus activates the transcription of interferon alpha/beta (IFN-α/β) in monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC). *Veterinary Microbiology*, *159*(3–4), 494–498.

Zhang, L., Zhou, L., Ge, X., Guo, X., Han, J., & Yang, H. (2016). The Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection suppresses Th17 cells response in vivo. *Veterinary Microbiology*, *189*, 75–85.

Zhao, P., Ma, C., Dong, X., & Cui, Z. (2012). Evolution of quasispecies diversity for porcine reproductive and respiratory syndrome virus under antibody selective pressure. *Science China Life Sciences*, *55*(9), 788–792.

Zhou, Y., Lin, G., Baarsch, M. J., Scamurra, R. W., & Murtaugh, M. P. (1994). Interleukin-4 suppresses inflammatory cytokine gene transcription in porcine macrophages. *Journal of*

*Leukocyte Biology*, *56*(4), 507–513.

université PARIS-SACLAY | ÉCOLE DOCTORALE Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)

**Titre :** Réponse immunitaire innée et adaptative du porc face au virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin

**Mots clés :** SDRPv, porc, macrophages, DC, poumon, ganglions

**Résumé :** Le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRPv) est un pathogène à l'origine de problèmes respiratoires et de reproduction. La réponse immunitaire face au SDRPv est caractérisée par une virémie persistante et un retard dans la mise en place des anticorps neutralisants. Les macrophages alvéolaires (AM) sont la cible principale du virus mais plusieurs études *in vitro* suggèrent une infection des cellules dendritiques (DC). Dans ce manuscrit, de nouvelles cibles cellulaires du virus ont été découvertes dans le poumon et dans les ganglions trachéo-bronchiques. Les cellules du parenchyme pulmonaire AM-like sont infectés *in vivo* par le SDRPv de type 1. Alors que les cDC1, cDC2 et moDC du poumon ne sont pas infectées. La souche Lena type 1.3 se distingue des autres souches par sa capacité à induire une polarisation vers une réponse Th1 *in vitro*. Une expérience de transfert de lymphocytes T mémoires *in vivo* suggèrent une réponse cellulaire accrue et délétère lors de l'infection par la souche Lena. Trois populations de MΦ ont été identifiées dans les ganglions et nomées : MΦ périfolliculaires (PFMΦ), MΦ des cordons lymphatiques (cordMΦ) et MΦ efférents (effMΦ). Les effMΦ et les PFMΦ sont infectés par les souches européennes. Quant à la réponse humorale, 5 stades de différenciation des LB dans les ganglions ont été identifiés et une étude sur l'impact de l'infection sur la différenciation des lymphocytes B est en cours.

**Title :** Innate and adaptive immune responses against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)

**Keywords :** PRRSV, swine, macrophages, DC, lung, lymph nodes

**Abstract :** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a single-stranded RNA virus that causes reproductive failure and respiratory problems in swine. Immune response against PRRSV is characterized by a persistent viremia and a delay in neutralizing antibodies' production. Main targets of PRRSV are Alveolar Macrophages (AM) but *in vitro* studies suggest that PRRSV could replicate in dendritic cells (DC). In this manuscript, new cellular targets of PRRSV in the lung and the trachea-bronchial lymph nodes have been depicted. This work revealed that pulmonary parenchymal AM-like are susceptible to PRRSV *in vivo*. Moreover, study of DC infection in the lung reveals that cDC1, cDC2 and moDC are not infected by type 1 PRRSV. In tracheobronchial lymph nodes, 3 populations of macrophages (MΦ) have been identified. Pig lymph nodes MΦ have been called perifollicular MΦ (PFMΦ), lymphatic cord MΦ (cordMΦ) and efferent MΦ (effMΦ). *In vivo* infection revealed that PFMΦ and effMΦ are susceptible to type 1 PRRSV infection. In order to understand the delay in humoral response establishment, 5 populations of B cells have been identified in the lymph nodes. The interaction of SDRPv with these populations is under study.

**Université Paris-Saclay**
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France