



HAL
open science

Etude immuno-virologique de la co-infection par les virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin et de l'influenza porcin : mieux comprendre les interactions virales pour mieux contrôler les infections

Juliette Bougon

► To cite this version:

Juliette Bougon. Etude immuno-virologique de la co-infection par les virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin et de l'influenza porcin : mieux comprendre les interactions virales pour mieux contrôler les infections. Virologie. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B061 . tel-03678826

HAL Id: tel-03678826

<https://theses.hal.science/tel-03678826v1>

Submitted on 25 May 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : Microbiologie, Virologie et Parasitologie

Par

Juliette BOUGON

Etude immuno-virologique de la co-infection par les virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin et de l'influenza porcin

Mieux comprendre les interactions virales pour mieux contrôler les infections

Thèse présentée et soutenue à Ploufragan, le 17 décembre 2021

Unité de recherche : ANSES Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Virologie Immunologie Porcines

Rapporteurs avant soutenance :

Dr. Caroline Goujon
Pr. Gilles Meyer

Chargée de recherche, Institut de Recherche en Infectiologie, Montpellier, France
Professeur, INRAE/ENVT, Toulouse, France

Composition du Jury :

Examineurs :

Dr Caroline Goujon
Pr. Gilles Meyer
Dr. Mustapha Si-Tahar
Pr. François Meurens

Chargée de recherche, Institut de Recherche en Infectiologie, Montpellier, France
Professeur, INRAE/ENVT, Toulouse, France
Directeur de recherche, Centre d'étude des pathologies respiratoires, Tours, France
Professeur, INRAE/Oniris, Nantes, France (Président du jury)

Directeur de thèse :

Dr. Gaëlle Simon

Directeur de projets de recherche, ANSES, Ploufragan, France

Co-directeur de thèse :

Dr. Olivier Bourry

Chargé de projets de recherche, ANSES, Ploufragan, France

« Le rêve dessine le chemin,
la volonté l'ouvre,
le cœur lui donne sa couleur »

Marie Guillon

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier très sincèrement les membres de mon jury de thèse : Caroline Goujon, Gilles Meyer, Mustapha Si-Tahar et François Meurens. Merci d'avoir consacré votre temps à évaluer ce travail. J'exprime aussi toute ma reconnaissance aux membres de comité de suivi individuel : Isabelle Schwartz-Cornil, Agnès Waret-Szkuta et Sascha Trapp qui m'ont apporté de précieux conseils. Je remercie également l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qui m'a accueilli et la région Bretagne, le Conseil départemental des Côtes d'Armor et Saint-Brieuc Armor Agglomération pour avoir financé de cette thèse.

Un grand merci à Gaëlle Simon, ma directrice de thèse, et Olivier Bourry, mon co-directeur de thèse. Merci pour votre accueil, votre soutien et vos encouragements prodigués tout au long de ces trois années de thèse. Egalement, un grand merci pour votre disponibilité et vos précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce projet de thèse. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Evidemment, je remercie chaleureusement tous les membres des équipes Grippe et SDRP : Céline Deblanc et Patricia Renson, pour vos encadrements techniques et scientifiques, ainsi que pour vos encouragements et vos soutiens ; Séverine Hervé, pour son optimisme et sa bonne humeur, Stéphane Gorin ; Stéphane Quéguiner ; Nicolas Barbier ; Sophie Mahé et Mireille LeDimna pour leur aide, et pour m'avoir formé tout au long de ma thèse dans la bonne humeur. Merci aussi à tous mes autres collègues de l'unité VIP pour leur sympathie et leur soutien : Virginie Loiselier, Aurélie Oger, Evelyne Hutet, Marie-Lou Jouannigot, Amélie Chastagner et bien sûr Marie-Frédérique LePotier. C'était un réel plaisir de travailler avec vous tous, trois ans ça passe vite, et encore plus vite quand une crise sanitaire s'invite. Merci également à tous les animaliers du SPPAE qui ont participé à ces essais, sans qui rien de tout cela n'aurait pu se faire : Frédéric Paboeuf, Gérald Lediguerher, Nadège Morin, Angélique Moro et Yann Bailly. Je remercie également Nicolas Bertho et Georges Saadé pour leur collaboration au cours de ce projet de thèse. Merci aux autres doctorants de l'ANSES avec qui je me suis liée d'amitié au cours de ces trois années. Egalement un grand merci à Maud Contrant et Rachel Busson qui ont été d'un très grand soutien, chose que je n'oublierai jamais. Enfin, merci à mon Père, ma Mère et mon Frère qui ont indirectement subi toutes les étapes de ma thèse, mais également tout mon cursus académique. Votre soutien inconditionnel m'a permis de tenir jusqu'au bout. Sans vous je n'y serai jamais arriver.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	4
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES FIGURES	9
AVANT-PROPOS	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1 LE COMPLEXE RESPIRATOIRE PORCIN (CRP)	14
1.1 Définition et épidémiologie	14
1.2 Facteurs impliqués dans le CRP	15
1.2.1 Agents infectieux	15
1.2.2 Facteurs non infectieux	17
1.3 Interactions des agents infectieux dans le CRP et conséquences sur le tractus respiratoire porcine	17
2 LE SYNDROME DYSGENESIQUE ET RESPIRATOIRE PORCIN (SDRP)	19
2.1 Découverte	19
2.2 Le virus du SDRP (SDRPV)	19
2.2.1 Taxonomie	19
2.2.2 Structure et composants du SDRPV	21
2.2.3 Cycle viral	23
2.2.4 Evolution génétique	26
2.3 Clinique et physiopathologie de l'infection à SDRPV chez le porc	27
2.3.1 Signes cliniques	27
2.3.2 Lésions pulmonaires (macroscopique et microscopique)	28
2.3.3 Virulence et sensibilité	29
2.4 Epidémiologie	30
2.4.1 Prévalence et conséquences économiques pour la filière porcine	30
2.4.2 Mode de transmission et persistance du SDRPV	32
2.5 Défenses de l'hôte vis-à-vis du SDRPV	34
2.5.1 Modulation de l'immunité innée par le SDRPV	34
2.5.2 Immunité adaptative	39
2.6 Prévention et contrôle	42
2.6.1 Contrôle et élimination	42
2.6.2 Vaccination	44
3 L'INFLUENZA PORCIN	50

3.1	Découverte	50
3.2	Les virus influenza porcins de type A (swIAV)	50
3.2.1	Taxonomie et classification	50
3.2.2	Structure et composants des IAV	51
3.2.3	Cycle viral	54
3.2.4	Variabilité des virus influenza A	58
3.3	Clinique et physiopathologie des infections swIAV	60
3.3.1	Signes cliniques	60
3.3.2	Lésions pulmonaires	61
3.3.3	Facteurs de virulence	62
3.4	Epidémiologie	65
3.4.1	Situation des swIAV en Europe et en France	65
3.4.2	Formes épidémiologiques de la grippe chez le porc	68
3.4.3	Mode de transmission	69
3.4.4	Conséquences économiques pour la filière porcine	69
3.5	Défenses de l'hôte vis-à-vis des swIAV	69
3.5.1	Immunité innée	69
3.5.2	Immunité adaptative	74
3.5.3	Mémoire immunitaire et protection croisée	75
3.6	Prévention et contrôle	77
3.6.1	Mesure de gestion	78
3.6.2	Vaccination	79
4	LES INTERACTIONS VIRALES et BACTERIENNES dans un CONTEXTE de CO- INFECTIONS IMPLIQUANT le SDRPV et/ou les swIAV	82
4.1	Co-infections virales ou bactériennes impliquant le SDRPV	84
4.2	Co-infections virales ou bactériennes impliquant les swIAV	86
4.3	Co-infections SDRPV/swIAV	88
	OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	91
	RESULTATS	95
	Etude virologique et immunologique de la co-infection SDRPV/swIAV chez les porcs inoculés en conditions expérimentales	96
	Etude de la co-infection SDRPV/swIAV dans un modèle de co-culture de macrophages alvéolaires et de cellules épithéliales de trachée	122
	Impact d'une infection concomitante par un swIAV sur la vaccination des porcelets contre le SDRP à l'aide d'un vaccin vivant atténué	140
	DISCUSSION GENERALE et PERSPECTIVES	160
	REFERENCES	172

ANNEXES	193
ANNEXE 1: Publication n°4 «Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract »	194
ANNEXE 2 : Attestation de management qualité de la thèse	239

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	Analyses en composantes principales
ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity ou cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOM	Anticorps neutralisant d'origine maternelle
ANSES	Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AOM	Anticorps d'origine maternelle
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	Acide ribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messager
BAL	Broncho-alveolar lavage ou lavage broncho-alvéolaire
BALC	Broncho-alveolar lavage cells ou cellules de lavage broncho-alvéolaire
BALF	Broncho-alveolar lavage fluid ou surnageant de lavage broncho-alvéolaire
BALT	Bronchus-associated lymphoid tissue ou tissu lymphoïde associé aux bronches
BHK	Baby hamster kidney cells ou cellules rénales de jeune hamster
CCU	Color-changing unit ou unité de changement de couleur
CDCD	Cesarean-derived colostrum deprived ou obtenu par césarienne et privé de colostrum
CD-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non integrin
cfu	Colony-forming unit ou unité formant colonie
cH1N1	Virus H1N1 classique
CLR	C-type lectin receptor
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CRP	Complexe respiratoire porcin
CTL	Cytotoxic T lymphocyte ou lymphocyte T cytotoxique
ECP	Effet cytopathique
EID₅₀	50% embryonic infectious dose ou dose infectieuse à 50% en œufs embryonnés
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot
EOPS	Exempts d'organismes pathogènes spécifiés
GMQ	Gain moyen quotidien
GP	Glycoprotéine
HA ou H	Hémagglutinine
HP-SDRPV	Virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin hautement pathogène
hpi	Heure post-inoculation
H1_{av}N1	H1N1 du lignage "avian-like swine H1N1"
H1_{av}N2	H1N2 du lignage "avian-like swine H1N2"
H1_{hu}N2	H1N2 du lignage "human-like reassortant swine H1N2"
H1N1pdm	H1N1 pandémique
IAV	Influenza A virus(es) ou virus de influenza de type A
IFITM	Interferon-inducible transmembrane protein ou protéine transmembranaire induite par l'interféron

IFN	Interféron
IFN-I	Interféron de type I
IFNAR	Type I interferon receptor
IFN-γ-SC	IFN- γ secreting cells ou cellules sécrétrices d'IFN- γ
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IN	Intra-nasale
IM	Intra-musculaire
IRF	Interferon regulatory factor ou facteur de régulation d'interféron
ISG	Interferon stimulated gene ou gène stimulé par l'interféron
ISGF	Interferon stimulated gene factor ou facteur des gènes stimulé par l'interféron
ISRE	Interferon stimulated response element
IT	Intra-trachéale
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription
jpi	Jours post-inoculation
KV	Killed vaccine ou vaccin inactivé
LAIV	Live attenuated influenza vaccines ou vaccin vivant atténué contre les virus de l'influenza
LCH	Load close homogenise ou entrée fermeture homogénéisation
LLPC	Long-lived plasma cells ou plasmocytes à longue durée de vie
LNR	Laboratoire national de référence
LT	Lymphocyte T
LTfh	Lymphocyte T follicular helper
LTh	Lymphocyte T helper
LTreg	Lymphocyte T régulateur
M1 et M2	Protéines de matrice 1 et 2
MBC	Memory B cell ou lymphocyte B mémoire
McREBEL	Management changes to reduced exposure to bacteria and eliminated losses ou changements apportés à la gestion pour réduire l'exposition aux bactéries et pour en éliminer les pertes
Mda5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MEM	Milieu essentiel medium ou milieu de culture essentiel
Mhp	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
MLV	Modified live vaccine ou vaccin vivant modifié
MLV-1	Type 1 Modified live vaccine ou vaccin vivant modifié de type 1
MOI	Multiplicity of infection ou multiplicité des infections
MxA	Myxovirus resistance
NA ou N	Neuraminidase
NEP ou NS2	Protéines d'export nucléaire
NES	Signaux d'exportation nucléaire
NF-κB	Nuclear factor κ B ou facteur nucléaire kappa B
NK	Natural killer ou cellule tueuse naturelle
NLR	Nod-like receptor ou récepteur de type Nod
NLRP3	Nucleotide oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3
NLS	Nuclear localization signal ou signal de localisation nucléaire
NOS2	Oxyde nitrique synthase 2

NP	Nucléoprotéine
NPC	Complexe du pore nucléaire
NPTr	Newborn pig trachea cells ou cellules de trachée de porcelet nouveau-né
nsp	Protéine non structurale
NS1	Protéine non structural 1
OAS	Oligoadenylate synthetase
ORF	Open reading frame ou cadre ouvert de lecture
PA	Polymérase acide
PAM	Porcine alveolar macrophage ou macrophage alvéolaire porcine
PB1 et PB2	Polymérase basique 1 et 2
PB1-F2	Polymerase basique 1-frame 2
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell ou cellule mononucléée du sang périphérique
PCLS	Precision-cut lung slices
PCR	Polymerase chain reaction ou réaction en chaîne par polymérase
PCV2	Porcine circovirus type 2 ou circovirus porcine de type 2
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
pfu	Plaque-forming unit ou unités formant des plages
Pig-MAP	Pig-major acute phase protein
PIM	Pulmonary intravascular macrophage ou macrophage pulmonaire intravasculaire
PK	Porcine kidney cell ou cellule rénale porcine
PKR	Protein kinase RNA-dependent ou protéine kinase dépendante de l'ARN
pp	Polyprotéine
PRCoV ou PRCV	Porcine respiratory coronavirus ou coronavirus respiratoire porcine
PRDC	Porcine respiratory disease complex ou complexe respiratoire porcine
PRR	Pattern recognition receptor ou récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PRRS	Porcine reproductive and respiratory syndrome
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
PRRSV-1	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus species 1
PRRSV-2	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus species 2
PS	Pénicilline-streptomycine
PTEC	Proximal tubule epithelial cell ou cellule épithéliale primaire humaine du tube contourné proximal
R0	Ratio de reproduction
Résavip	Réseau national de surveillance des virus influenza chez le porc
RIG-I	Retinoic acid inducible gene-I
RLR	RIG-I like receptor ou récepteurs induits par l'acide rétinoïque
RTC	Replication and transcription complex ou complexe de réplication et de transcription
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction ou transcription inverse suivie d'une PCR
RT-qPCR	Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction ou transcription inverse quantitative suivie d'une PCR

SA	Sialic acid ou acide sialique
SAA	Protéine amyloïde sérique A
SP-D	Protéine surfactante de type D
SDRP	Syndrome dysgénésique et respiratoire porcin
SDRPV	Virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin
SDRPV-1	Virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin espèce 1
SDRPV-2	Virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin espèce 2
Siglec-1	Sialic acid-binding immunoglobulin [Ig]-like lectin 1
SOCS	Suppressor of cytokine signaling ou suppresseur de la voie de signalisation des cytokines
SPPAE	Service expérimental de porcs assainis et expérimentation
SRCR-5	Scavenger receptor cystein-rich-5
swIAV	Swine influenza A virus ou virus influenza A porcin
TCID₅₀	50% tissue culture infectious dose ou dose infectieuse à 50% en culture cellulaire
T_{cm}	Central memory T cell ou lymphocyte de mémoire centrale
T_{em}	Effector memory T cell ou lymphocyte T mémoire effecteur
TGF-β	Transforming growth factor beta ou facteur de croissance transformant beta
TLR	Toll-like receptor ou récepteur de type Toll
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha ou facteur nécrosant de tumeur alpha
T_{rm}	Tissue-resident memory T cell ou lymphocyte T mémoire résidant dans les tissus
vRNP	Ribonucléoprotéine virale

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Agents pathogènes communément reconnus comme présentant un intérêt majeur ou mineur pour la production porcine, en raison de leur capacité à provoquer des maladies et des lésions respiratoires par eux-mêmes (intérêt majeur) ou dans les circonstances d'une infection simultanée avec d'autres agents pathogènes (intérêt mineur)

Tableau 2 : Signes cliniques chez les porcs infectés par le SDRPV

Tableau 3 : MLV contre le SDRPV disponibles dans le commerce

Tableau 4a: Liste non exhaustive d'essais expérimentaux réalisés chez le porc afin d'étudier les co/super-infections SDRPV/virus et SDRPV/bactérie dans le contexte du CRP

Tableau 4b : Liste non exhaustive d'études *in vitro* de co/super-infections SDRPV/virus

Tableau 5a : Liste non exhaustive d'essais expérimentaux réalisés chez le porc afin d'étudier les co/super-infections swIAV/virus et swIAV/bactérie dans le contexte du CRP

Tableau 5b : Liste non exhaustive d'études *in vitro/ex vivo* de co/super-infections swIAV/virus

Tableau 6a : Liste non exhaustive d'essais expérimentaux réalisés chez le porc afin d'étudier les co/super-infections SDRPV/swIAV dans le contexte du CRP (*in vivo*)

Tableau 6b : Liste non exhaustive d'études *in vitro* sur les co/super-infections SDRPV/swIAV dans le contexte du CRP

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : (A) Anatomie d'un poumon de porc sain. Observations macroscopiques (B) et microscopiques (C et D) d'un poumon de porc infecté par *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) et le swIAV (H1N1) (7 jours après l'infection à swIAV)

Figure 2 : Résumé des mécanismes et des conséquences possibles des infections virales et/ou bactériennes, simples ou multiples, au niveau du tractus respiratoire du porc

Figure 3 : Taxonomie des *Arteriviridae*

Figure 4 : Structure du génome du SDRPV. A) Organisation de l'ARN génomique viral ; B) Structure du virion

Figure 5 : Topologie des protéines structurales de l'enveloppe du SDRPV

Figure 6 : Récepteurs cellulaires du SDRPV

Figure 7 : Cycle de réplication des Arterivirus

Figure 8 : Photographies des manifestations induites par une infection par le SDRPV. A) Porc anorexique. B) Cyanose des oreilles. C) Mort fœtale progressive sur une portée. D) Lésions de pneumonie sur un poumon de porc de 14 semaines d'âge

Figure 9 : Répartition géographique des deux espèces de SDRPV à travers le monde

Figure 10 : Prévalences des infections à virus SDRP en France continentale

Figure 11 : Conséquences économiques du SDRP dans l'industrie porcine

Figure 12 : Voie de signalisation induite par la production d'IFN-I et conduisant à la production de protéines antivirales

Figure 13 : A) Interférence dans la production d'IFN-I par les protéines du SDRPV. B) Interférence dans la voie de signalisation JAK-STAT par les protéines du SDRPV

Figure 14 : Dérégulation du système immunitaire de l'hôte suite à une infection par le SDRPV

Figure 15 : Réponses adaptatives induites chez le porc au cours d'une infection SDRPV

Figure 16 : Structures des IAV. A) Schéma des hits segments génétiques de l'ARN viral qui composent les génomes des IAV. B) Diagramme des ARNm viraux qui sont transcrits à partir des modèles d'ARN viraux des IAV. C) Schéma des IAV

Figure 17 : Rôle des protéines non structurales dans la réplication des IAV et dans la défense innée de l'hôte

Figure 18 : Cycle de réplication des IAV dans des cellules épithéliales

Figure 19 : Cycle de réplication des IAV dans des macrophages

Figure 20 : La place du porc dans un schéma de la transmission inter-espèces des IAV

Figure 21 : Lésions pulmonaires de porcs infectés par un swIAV (Haut, gauche) Poumon *in situ*, porc âgé de 4 semaines, 5 jours post inoculation intratrachéale d'un swIAV. Consolidation lobulaire multifocale dans les lobes pulmonaires crâniens et moyens. (Haut, droite) Poumon, porc, cas de terrain. Nécrose et desquamation des cellules épithéliales bronchiolaires et aplatissement des cellules restantes qui tapissent les voies respiratoires (phase aiguë de l'infection). (Bas gauche) Poumon, porc, cas de terrain. Une couche épithéliale hyperplasique irrégulière qui tapisse les voies respiratoires (phase subaiguë de l'infection). (Bas droite) Poumon de porc, cas de terrain. Bronchiolite oblitérante

Figure 22 : Principaux sous-types de swIAV en Europe

Figure 23 : Rôles des acteurs de Résavip

Figure 24 : (Haut) Proportions des différents lignages identifiés en France de 2012 à 2020. (Bas) Proportions des différents lignages par région en 2020

Figure 25 : Génotypes des swIAV enzootiques et des virus de lignage H1_{av}N2 identifiés en France en 2019-2020.

Figure 26 : Réponse immunitaire mise en place lors d'une infection IAV chez les mammifères

Figure 27 : Cinétique de la charge virale au niveau pulmonaire, de la production de PPA, des cytokines ainsi que des différents composants du système immunitaire (anticorps anti-swIAV, cellules productrices d'IFN- γ et les lymphocytes) au cours d'une infection par des swIAV

Figure 28 : Les stratégies actuelles et prospectives disponibles pour lutter contre les swIAV

Figure 29 : Impact des co-infections sur les signes cliniques dans le contexte du CRP. A) Co-infection virus/virus. B) Co-infection virus/bactéries. Les chiffres indiqués sur la figure correspondent au nombre d'études identifiées pour la même combinaison de pathogènes.

AVANT-PROPOS

Les maladies respiratoires, généralement associées à de lourdes pertes économiques, représentent un problème sanitaire majeur dans les élevages de porcs. Ces pathologies respiratoires peuvent être dues à des infections virales ou bactériennes simples, mais résultent bien souvent d'infections combinées, séquentielles ou simultanées, impliquant plusieurs agents pathogènes à tropisme respiratoire. Ces troubles sont alors rassemblés sous la dénomination de « complexe respiratoire porcin (CRP) » en français, ou « *porcine respiratory disease complexe* (PRDC) » en anglais.

Parmi les agents pathogènes majeurs du CRP, on retrouve le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRPV) et les virus influenza porcin de type A (swIAV). Le SDRPV, spécifique du porc, induit une des maladies les plus coûteuses pour la production porcine. L'infection à SDRPV conduit à de graves problèmes de reproduction chez les truies en gestation, ainsi que des problèmes respiratoires et de croissance chez les porcelets. Le SDRPV, dont les cibles principales sont les macrophages pulmonaires, est capable de se disséminer au sein de l'organisme et d'induire une infection de longue durée. En réponse à cette maladie très pénalisante pour les élevages porcins, de nombreux efforts dans la lutte contre ce virus ont été déployés, dont la vaccination. Majoritairement utilisés au sein des élevages infectés, les vaccins vivants atténués, ou *modified live vaccine* (MLV) en anglais, permettent une réduction de la clinique associée à cette maladie, voire un contrôle de la transmission virale. Les swIAV sont également l'une des principales préoccupations pour les producteurs et les plateformes de surveillance à cause des lourdes conséquences économiques qu'ils provoquent au sein de la filière porcine mais également en raison de leur potentiel zoonotique. Ces virus se multiplient préférentiellement dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire. L'infection à swIAV, qui est rapidement résolutive, peut survenir au moment, ou après, le sevrage des porcelets, soit la période où les MLV anti-SDRPV sont généralement administrés. Ceux-ci pourraient donc conduire à de possibles interférences entre l'infection à swIAV et la vaccination MLV anti-SDRPV.

Plusieurs enquêtes épidémiologiques réalisées au sein de notre laboratoire ont révélé la présence de ces deux agents pathogènes au sein d'un même élevage. Cependant, si au cours des dernières années de nombreuses études se sont focalisées sur les infections impliquant les swIAV ou le SDRPV de manière individuelle, les interactions apparemment possibles entre ces deux agents pathogènes sont encore largement incomprises. Or, connaître les interactions

éventuelles entre ces deux agents pathogènes, ainsi que les mécanismes sous-jacents à ces interactions, permettrait d'apporter des connaissances supplémentaires sur le CRP et éventuellement d'améliorer les stratégies de contrôle. C'est dans ce contexte que s'est inscrit ce projet de thèse (PeRRSIV).

Le projet PeRRSIV visait à étudier les impacts cliniques, virologiques et immunologiques de la co-infection SDRPV/swIAV chez le porc, aux niveaux pulmonaires et systémiques, et à évaluer l'effet d'une infection à swIAV sur la vaccination anti-SDRPV. Pour ce faire, des expérimentations animales sur porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) ont été mises en place. Les excréctions virales, les réponses immunitaires innées pro- ou anti-inflammatoires et antivirales (interféron de type I), ainsi que les réponses adaptatives à médiation humorale et cellulaire, ont notamment été étudiées. Une étude complémentaire portant sur l'impact de la co-infection SDRPV/swIAV au niveau cellulaire a été initiée, avec la mise au point d'un système de co-culture de macrophages pulmonaires et de cellules épithéliales de trachée de porc.



**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

1 LE COMPLEXE RESPIRATOIRE PORCIN (CRP)

1.1 Définition et épidémiologie

La présence de maladies respiratoires a été initialement identifiée chez le porc dans les années 1960 (Loosli, 1968). Ces pathologies respiratoires sont très répandues dans les élevages porcins. La pneumonie et la pleurésie représentent les affections pulmonaires les plus fréquentes chez les porcs en croissance. Une étude du laboratoire a indiqué que 19 à 79% des porcs arrivant à l'abattoir présentaient des lésions de pneumonie et 4 à 62% présentaient de la pleurésie (Fablet et al., 2012a). Ces affections respiratoires peuvent être dues à des infections virales ou bactériennes simples, mais résultent bien souvent de situations plus complexes impliquant plusieurs agents pathogènes. Le terme « complexe respiratoire porcine (CRP) » ou « *porcine respiratory disease complex (PRDC)* » en anglais, est alors employé. Le CRP est une maladie porcine multifactorielle associée à des infections séquentielles ou simultanées par plusieurs virus ou bactéries à tropisme respiratoire (Opriessnig et al., 2011). D'un point de vue clinique, le CRP est souvent caractérisé par une faible croissance, une diminution de la consommation alimentaire, une léthargie, de la fièvre, de la toux et de la dyspnée (Thacker and Thanawongnuwech, 2002). Le taux de morbidité associé au CRP est compris entre 30 et 70%, alors que le taux de mortalité est quant à lui compris entre 4 et 6% (Opriessnig et al., 2011). L'ampleur des lésions pulmonaires macroscopiques dépend fortement des pathogènes impliqués et peut varier d'une faible étendue tissulaire à près de 100% du tissu touché. Fréquemment, les lésions macroscopiques sont situées dans les parties cranio-ventrales du poumon (figure 1A), où une décoloration et/ou un affaissement du tissu pulmonaire peuvent être observés (Fraile et al., 2010; Martínez et al., 2009) (figure 1B). De même, les lésions pulmonaires microscopiques peuvent varier selon les agents pathogènes impliqués, avec notamment une bronchopneumonie parfois associée à une pneumonie interstitielle (Harms et al., 2001; Kim et al., 2003) (figure C et D). Au-delà de l'impact sur le bien-être des animaux, le CRP engendre de lourdes pertes financières en raison de la baisse des performances zootechniques et du coût des intrants médicamenteux (Deblanc and Simon, 2017).

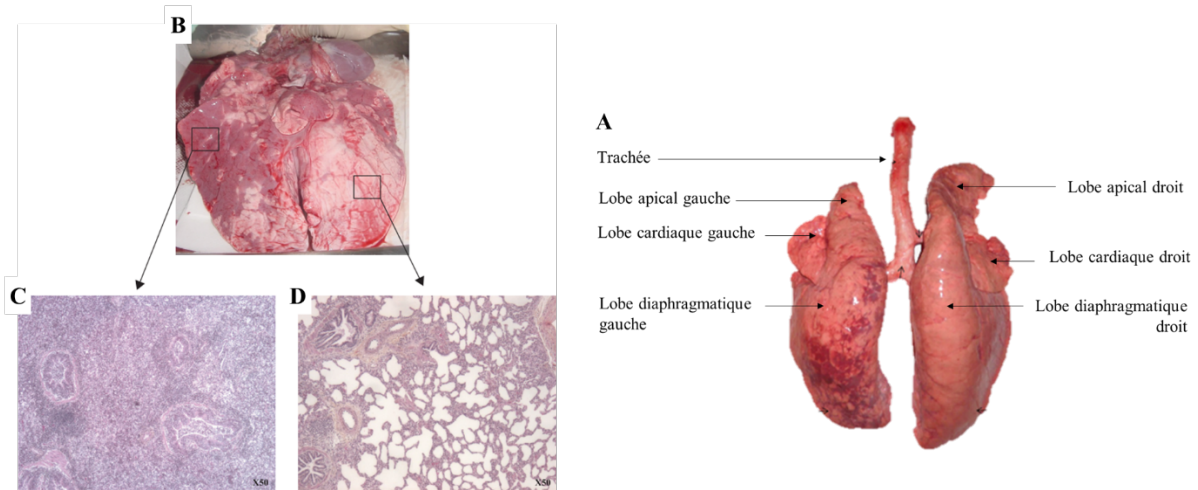


Figure 1 : A) Anatomie d'un poumon de porc sain (Judge et al., 2014). Observation macroscopiques (B) et microscopique (C et D) d'un poumon de porc infecté par *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) et le swIAV (H1N1) (7 jours après l'infection à swIAV) (Deblanc et al., 2012)

1.2 Facteurs impliqués dans le CRP

Le CRP est d'intensité variable et peut donc dépendre des interactions et synergies entre agents infectieux (viraux et bactériens), des facteurs environnementaux, des facteurs liés à la gestion de l'élevage (type, mode de conduite, etc.) ou des facteurs spécifiques du porc (génétique, âge et statut immunitaire).

1.2.1 Agents infectieux

Les agents pathogènes respiratoires peuvent être subdivisés en agents primaires ou secondaires/opportunistes (tableau 1) (Opriessnig et al., 2011). Les agents primaires sont capables d'induire des lésions sévères au niveau de l'arbre respiratoire en raison de leur propre virulence. Les agents pathogènes infectieux secondaires ou opportunistes ont généralement besoin de l'aide d'autres agents pathogènes co-infectants ou de co-facteurs pour induire des lésions importantes dans le système respiratoire.

Tableau 1 : Agents pathogènes communément reconnus comme présentant un intérêt majeur ou mineur pour la production porcine, en raison de leur capacité à provoquer des maladies et des lésions respiratoires par eux-mêmes (intérêt majeur) ou dans les circonstances d'une infection simultanée avec d'autres agents pathogènes (intérêt mineur). D'après Opriessnig et al., 2011

	Pathogènes	Primaire / secondaire	Intérêt majeure	Intérêt mineure
Virus	Virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRPV)	Primaire	x	
	Virus influenza porcins de type A (swIAV)	Primaire/secondaire	x	
	Virus de la maladie d'Aujeszky	Primaire	x	
	Circovirus porcin de type 2 (PCV2)	Primaire		x
	Coronavirus respiratoire porcin (PRCV)	Primaire		x
	Cytomégalovirus porcin	Primaire		x
Bactéries	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (Mhp)	Primaire	x	
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Primaire	x	
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Primaire	x	
	<i>Actinobacillus suis</i>	Primaire	x	
	<i>Salmonella spp.</i>	Secondaire	x	
	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Secondaire		x
	<i>Haemophilus parasuis</i>	Secondaire		x
	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Secondaire		x
	<i>Pasteurella multocida</i>	Secondaire		x
	<i>Streptococcus suis</i>	Secondaire		x

De nombreux agents pathogènes respiratoires peuvent persister chez l'hôte. Il n'est donc pas rare que plusieurs de ces agents infectieux puissent circuler en même temps dans un troupeau. Plusieurs études réalisées en France par notre laboratoire en 2011 et 2016 indiquaient que les infections par le Circovirus porcin de type 2 (PCV2), les virus influenza porcins de type A (swIAV), le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRPV) et *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) étaient très répandues dans les élevages puisque 75% des porcs possédaient des anticorps vis-à-vis du PCV2, entre 91.7% et 100% vis-à-vis des swIAV, 60% vis-à-vis du SDRPV et plus de 55% vis-à-vis du Mhp (Fablet et al., 2016a; Fablet et al., 2011). Egalement, une association significative entre la présence d'anticorps anti-SDRPV et la présence d'anticorps anti-H1N2 avait été observée (Fablet et al., 2016a).

Ainsi, trois agents infectieux sont principalement isolés à partir de porcs atteints de CRP : le swIAV, le SDRPV et Mhp. Ils sont donc considérés comme des acteurs majeurs du CRP (Alvarez et al., 2015; Opriessnig et al., 2011; Saade et al., 2020a). L'objectif de cette thèse

étant d'étudier les interactions entre les deux principaux virus du CRP, le swIAV et le SDRPV, suivront deux chapitres dédiés à chacun d'eux (parties 2 et 3 de ce manuscrit de thèse).

1.2.2 Facteurs non infectieux

Divers facteurs non infectieux contribuent de manière significative aux maladies respiratoires en favorisant la transmission et la propagation des agents infectieux. Ils vont ainsi créer des conditions défavorables qui entraîneront un stress accru sur l'animal ou altérer directement les voies respiratoires du porc (Martínez et al., 2009; Opriessnig et al., 2011). Ces facteurs peuvent être divisés en trois groupes : l'environnement, la gestion de l'élevage (taille du troupeau, nutrition, etc.) et les facteurs porcins (âge, génétique, race et statut immunitaire) (Cho et al., 2006; Opriessnig et al., 2011; White, 2011). Les facteurs environnementaux tels que les changements extrêmes de température, une humidité élevée, la poussière ou des polluants aériens peuvent prédisposer les porcs au développement du CRP. Les moisissures ou les mycotoxines possiblement présentes dans les aliments peuvent endommager directement les poumons ou compromettre l'immunité des animaux (Opriessnig et al., 2011). Les carences nutritionnelles peuvent également affecter le système immunitaire de l'hôte. Le CRP est principalement observé chez les porcs en croissance, généralement âgés d'environ 12 à 24 semaines (Thacker, 2001). Des preuves de sensibilité accrue de certaines races, ou de lignées génétiques au sein des races de porcs, aux infections induites par certains virus du CRP, SDRPV (Vincent et al., 2006) et PCV2 (Opriessnig et al., 2006a; Opriessnig et al., 2009) ont été observées. Lorsque des porcs provenant de plusieurs sites et ayant des statuts immunitaires différents sont mélangés, la propagation de la maladie peut être renforcée. La vaccination peut être utilisée comme un moyen d'harmonisation du statut immunitaire des animaux (Opriessnig et al., 2011).

1.3 Interactions des agents infectieux dans le CRP et conséquences sur le tractus respiratoire porcine

Les interactions entre les différents agents pathogènes peuvent avoir un rôle important dans le développement et l'apparition du CRP. Bien que certains agents pathogènes soient capables d'induire des troubles respiratoires de manière indépendante, une infection simultanée par deux ou plusieurs agents pathogènes entraîne généralement des signes cliniques et des lésions

pulmonaires plus graves que ceux observés suite à une infection par un seul des agents pathogènes (Saade et al., 2020a). Parmi les mécanismes connus par lesquels les agents pathogènes impactent l'appareil respiratoire des animaux, on peut citer l'endommagement de l'appareil mucociliaire permettant la colonisation bactérienne, la suppression de la réponse immunitaire, l'altération des réponses cytokiniques ou l'altération de la fonction des macrophages (figure 2). La combinaison de ces divers mécanismes aboutira à une maladie respiratoire qui peut être sévère.

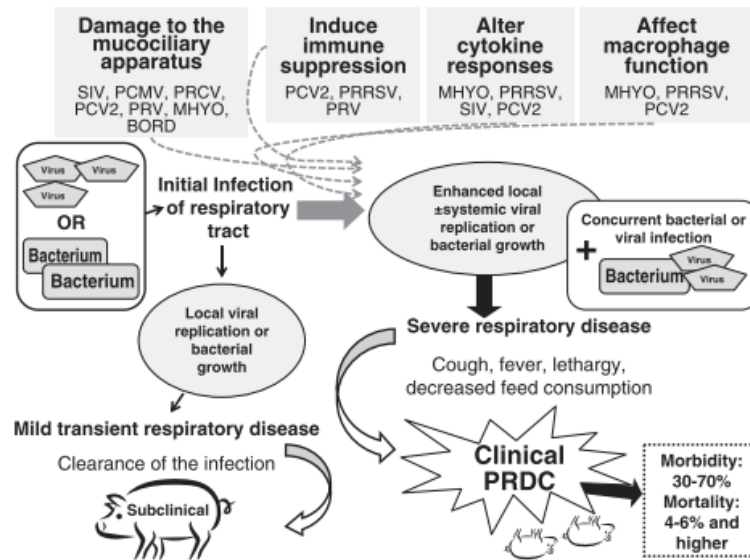


Figure 2 : Résumé des mécanismes et des conséquences possibles des infections virales et/ou bactériennes, simples ou multiples, au niveau du tractus respiratoire du porc (Opriessnig et al., 2011)

Un état des lieux des connaissances relatives aux interactions impliquant les infections par le SDRPV et/ou le swIAV fait l'objet d'un chapitre dédié à suivre (voir partie 4 de la synthèse bibliographique du manuscrit de thèse).

2 LE SYNDROME DYSGENESIQUE ET RESPIRATOIRE PORCIN (SDRP)

2.1 Découverte

A la fin des années 1980, une maladie porcine, jusqu'alors inconnue, émerge quasi-simultanément en Amérique du Nord et en Europe. Cette maladie initialement appelée « *mystery swine disease* » (Hill, 1990), puis « maladie de l'oreille bleue » (OIE), sera par la suite connue sous le nom de « *porcine reproductive and respiratory syndrome* » (PRRS) en anglais ou « syndrome dysgénésique et respiratoire porcine » (SDRP) en français. En Europe, au début des années 1990, le SDRP touche dans un premier temps l'Allemagne, puis se répand alors très rapidement dans la population porcine, se propageant ainsi aux Pays-Bas, en Belgique, en Espagne, au Royaume-Uni et en France (Albina, 1997). Cette maladie, dont l'origine demeure toujours incertaine, se traduit par des pneumonies sévères chez les porcelets, une diminution des performances de croissance, une augmentation des cas d'avortements chez les truies en fin de gestation, ainsi qu'une augmentation de la mortalité (Hill, 1990). C'est en 1991, que l'agent étiologique fut isolé pour la première fois au Central Veterinary Institute à Lelystad aux Pays-Bas où il fut nommé « Lelystad virus » (Wensvoort et al., 1991a; Wensvoort et al., 1991b). Un an plus tard, le premier isolat américain fut appelé VR-2332 (Collins et al., 1992). Le terme de « *porcine reproductive and respiratory syndrome virus* » (PRRSV) en anglais ou « virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcine » (SDRPV) en français a été adopté en 1992, lors du premier congrès international dédié à ce nouvel agent pathogène.

2.2 Le virus du SDRP (SDRPV)

2.2.1 Taxonomie

Le virus du SDRP (SDRPV) appartient à la famille des *Arteriviridae* et à l'ordre des *Nidovirales* (Adams et al., 2016). La nomenclature des *Arteriviridae* a été mise à jour en 2019, par le Comité International de Taxonomie des Virus. Cette famille regroupe aujourd'hui 6 sous-familles se déclinant en 13 genres (figure 3). Parmi ces derniers figure le genre *Betaarterivirus*, comprenant l'espèce *Betaarterivirus suis* 1 ou SDRPV-1 (PRRSV-1), majoritairement répandu en Europe et l'espèce *Betaarterivirus suis* 2 ou SDRPV-2 (PRRSV-

2), présent principalement en Amérique du Nord et en Asie (Adams et al., 2017; Siddell et al., 2019). Ces deux espèces ont une identité nucléotidique de seulement 50-60% (Ma et al., 2021).

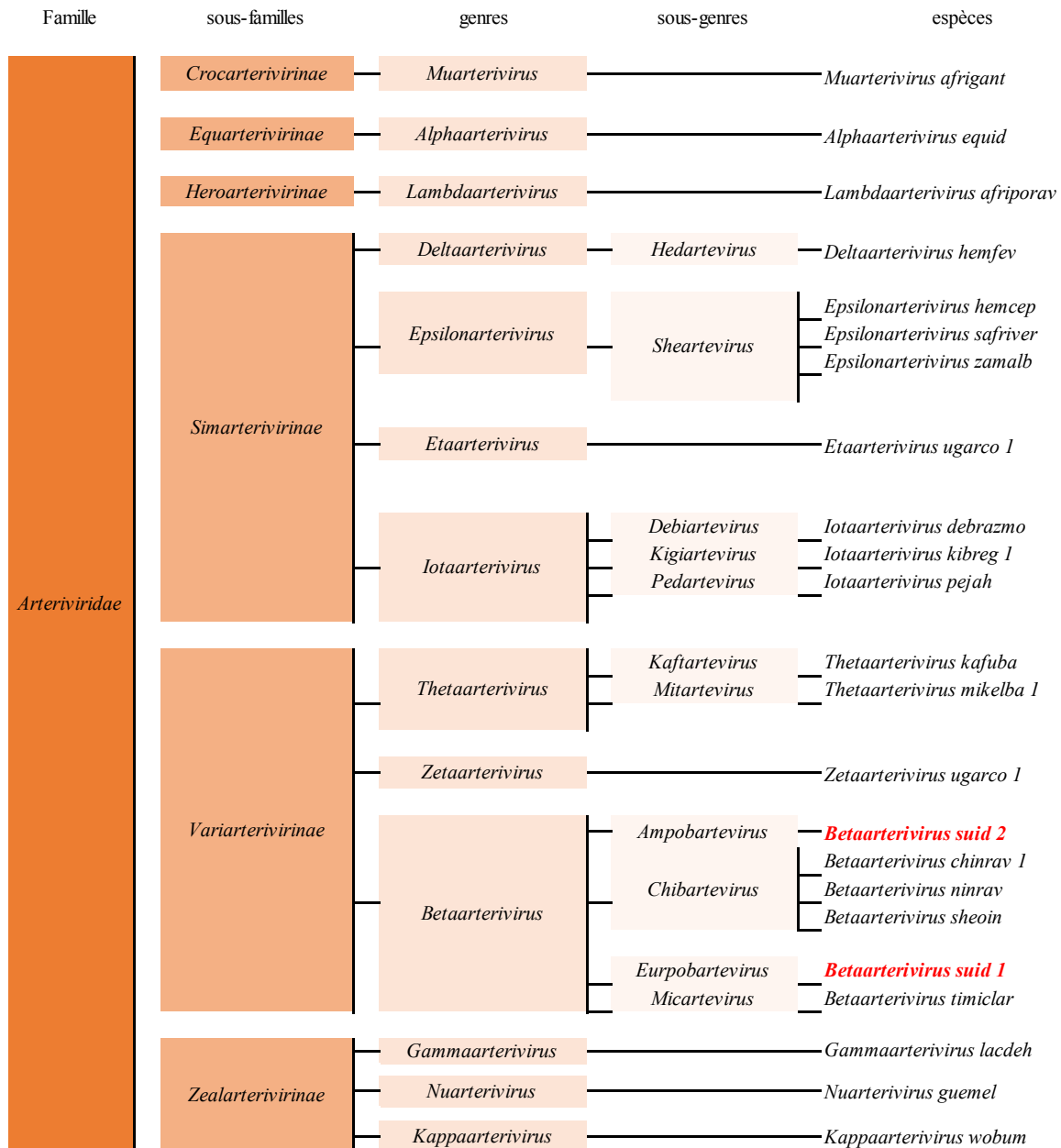


Figure 3 : Taxonomie des *Arteriviridae* (d'après le Comité International de Taxonomie des Virus de 2019, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>)

Les membres de la famille des *Arteriviridae* partagent la particularité de pouvoir se multiplier dans les macrophages et d'induire une infection persistante chez leur hôte naturel (Prieto and Castro, 2005).

2.2.2 Structure et composants du SDRPV

2.2.2.1 Organisation génomique du SDRPV

Le SDRPV est un virus enveloppé (50-65 nm) ayant un génome à ARN non-segmenté, linéaire, simple brin de polarité positive. Le génome du SDRPV (15 kb) contient une coiffe à son extrémité 5' et est polyadénylé à son extrémité 3' (figure 4) (Chaudhari and Vu, 2020). Il comporte 11 cadres de lecture ouverts (ORF1a à ORF7). L'ORF1a et l'ORF1b, localisés à l'extrémité 5' et partageant le même site d'initiation de la traduction, occupent 80% du génome viral et codent deux polyprotéines (pp), pp1a et pp1ab. La maturation des pp1a et pp1ab conduit à la synthèse de 14 protéines non structurales (*nonstructural proteins* (nsps)) suite à un clivage enzymatique. Les huit autres ORFs (ORFs 2a, 2b, 3, 4, 5, 5a, 6 et 7), occupant 25% du génome viral à l'extrémité 3', sont traduits à partir d'ARN messagers (ARNm) subgénomiques, et vont coder huit protéines structurales.

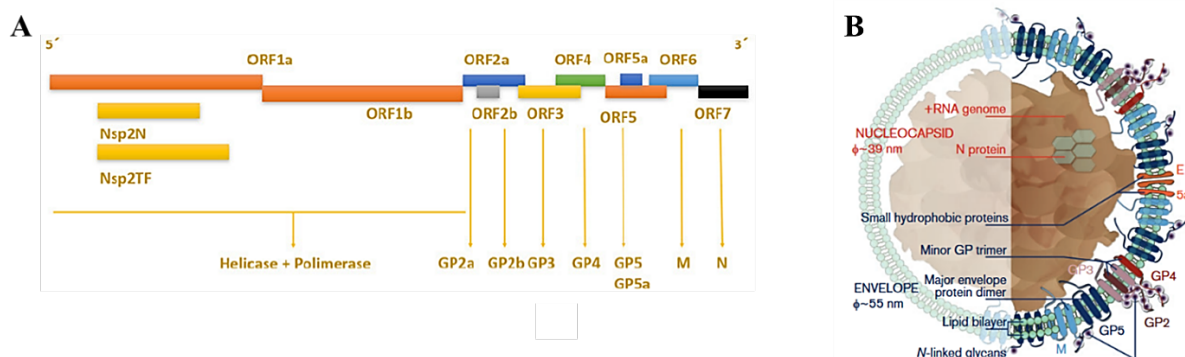


Figure 4 : Structure du génome du SDRPV. **A)** Organisation de l'ARN génomique viral (Montaner-Tarbes et al., 2019) ; **B)** Structure du virion (Snijder et al., 2013).

2.2.2.2 Protéines non structurales

Les pp1a et pp1ab codent quatre protéases (nsp1 α , nsp1 β , nsp2 et nsp4), une ARN polymérase ARN dépendante (nsp9), une hélicase (nsp10) et une endonucléase (nsp11) (den Boon et al., 1995; Snijder and Meulenberg, 1998; van Aken et al., 2006; Ziebuhr et al., 2000). Les nsp1 α , nsp1 β et nsp2 possèdent une activité protéolytique qui favorise le clivage des polyprotéines à leur jonction C-terminale et conduit à l'obtention de 14 nsps matures (den Boon et al., 1995; Ropp et al., 2004). La nsp2 est la protéine non structurale la plus variable, avec seulement 32% d'identité entre les séquences des nsp2 des deux espèces de SDRPV (Dokland, 2010). Les nsp9 et 10, codées par l'ORF1b, ont des rôles indispensables à la réplication virale. La nsp11 a un rôle dans le maintien du bon fonctionnement de la synthèse

d'ARN subgénomique au cours de la réplication (Kappes and Faaberg, 2015). Egalement, les nsps 1, 2, 4, 5 et 11 semblent avoir un rôle dans les mécanismes d'échappement au système immunitaire de l'hôte à travers leurs capacités à entraver l'expression de l'interféron de type I (IFN-I) (Fang and Snijder, 2010; Nauwynck et al., 2012; Snijder et al., 2013).

2.2.2.3 Protéines structurales

Le SDRPV est constitué d'une enveloppe lipidique sphérique issue de la cellule hôte qui entoure une nucléocapside non-icosaédrique (25-39 nm). Les protéines structurales, nommées glycoprotéines (GP)-2 (GP2), GP3, GP4 et GP5, la protéine de l'enveloppe E, la protéine de membrane M et la protéine 5a, sont enchâssées dans cette membrane lipidique (figure 5) (Dokland, 2010). La capside est constituée par la protéine N. Cette protéine est codée par l'ORF7 et est associée à l'ARN génomique viral pour constituer la nucléocapside.

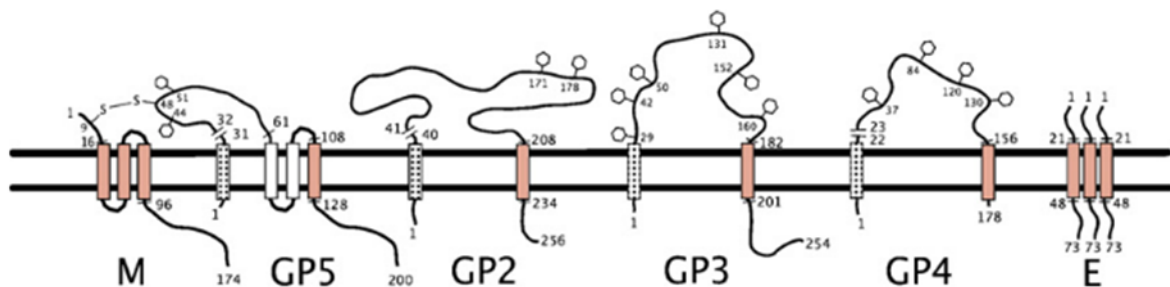


Figure 5 : Topologie des protéines structurales de l'enveloppe du SDRPV (Dokland, 2010)

Les protéines structurales majeures sont les protéines M, GP5 et N. Les protéines mineures sont les GP2, GP3, GP4, E et 5a. La protéine M, essentielle pour l'assemblage et le bourgeonnement du virus, va former un hétérodimère avec la protéine E via un pont disulfure (Dokland, 2010). La GP5 possède deux (SDRPV-1) ou trois (SDRPV-2) sites de glycosylation. Elle peut également être impliquée dans les interactions initiales avec la cellule hôte et est l'une des cibles des anticorps neutralisants (Dokland, 2010; Pirzadeh and Dea, 1997). La protéine N est la plus abondante durant l'infection virale, elle représente environ 40% des protéines du virion. Elle joue un rôle essentiel dans le cycle viral, notamment à l'étape d'encapsulation de l'ARN viral. Les protéines M, GP5 et N associées forment le core du virion et sont donc essentielles à l'infectiosité virale (Firth et al., 2011).

Concernant les protéines structurales mineures, la GP2 a un domaine transmembranaire et semble jouer un rôle dans la réplication virale, notamment dans les étapes d'internalisation et

de décapsidation du virion. Les GP2, GP3, GP4 et E forment un complexe protéique qui sera par la suite impliqué dans les étapes d'attachement et d'entrée du virus dans la cellule hôte (Dokland, 2010).

2.2.3 Cycle viral

2.2.3.1 Cellules cibles

Le SDRPV possède un tropisme pour les cellules myéloïdes et notamment les macrophages alvéolaires ou *porcine alveolar macrophages* (PAM), considérés comme étant la cible cellulaire principale de ce virus. Duan et al., avaient mis en évidence que des monocytes pouvaient également être infectés à un faible niveau (Duan et al., 1997).

Plus récemment, le SDRPV a été décrit comme étant capable de se répliquer dans les macrophages dérivés des monocytes circulants, ainsi que dans les macrophages pulmonaires intravasculaires ou *pulmonary intravascular macrophages* (PIM) (Crisci et al., 2019). Les PIM sont, à l'inverse des PAM, attachés à la paroi de l'endothélium des capillaires pulmonaires (Thanawongnuwech et al., 2000) et sont le lieu d'une répllication intense du SDRPV (Bordet et al., 2018). Ce virus peut également se répliquer dans les macrophages ou les cellules dendritiques des amygdales, des nœuds lymphatiques, des plaques de Peyer, de la rate, des reins, du foie, des glandes surrénales et du cœur (Albina, 1997; Bordet et al., 2019). Il peut être aussi retrouvé au niveau des cellules endothéliales du cœur, des cellules épithéliales et des pneumocytes de l'appareil respiratoire (Albina, 1997).

Les cultures de cellules primaires de PAM sont généralement utilisées comme modèle *in vitro* pour l'étude de l'infection à SDRPV. Des souches SDRPV ont été adaptées par de multiples passages successifs sur des lignées cellulaires provenant de cellules rénales de singe vert d'Afrique, de type MA-104, CL2621 et MARC-145, utilisées à des fins de recherche ou dans le cadre de production virale *in vitro*.

2.2.3.2 Récepteurs viraux

L'entrée du SDRPV dans les cellules cibles se fait par endocytose via l'interaction de complexes protéiques viraux avec des récepteurs cellulaires. Six récepteurs cellulaires du SDRPV, tels que, l'héparane-sulfate, la vimentine, le CD151, le CD163, la sialoadhésine ou *Sialic acid-bonding immunoglobulin [Ig]-like lectin 1* (Siglec-1), aussi connue sous le nom de

CD169 et la molécule DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) (ou CD209) ont été décrits (Zhang and Yoo, 2015) (figure 6).

Le récepteur CD163 est une glycoprotéine transmembranaire, d'environ 130 kDa, qui est restreint à la lignée des monocytes et des macrophages. Ce récepteur intervient entre autre dans l'élimination du complexe hémoglobine-haptoglobine, participant ainsi au processus anti-inflammatoire. Le CD163 a été identifié comme étant un récepteur indispensable à l'infection par les SDRPV-1 et SDRPV-2, notamment dans les étapes d'internalisation et de désassemblage. En effet, il a été montré qu'une surexpression du récepteur CD163 à la surface de cellules de lignées qui ne sont pas des cellules cibles naturelles du SDRPV les rendent permissives à l'infection (Van Gorp et al., 2008). D'autre part, des porcs Knock-Out pour l'expression du CD163 sont résistants aux souches hautement pathogènes du SDRPV (Yang et al., 2018). Le domaine SRCR-5 (*scavenger receptor cysteine-rich-5*) du récepteur CD163 est essentiel à l'infection puisqu'une délétion dans ce domaine SRCR-5 empêche l'infection par les SDRPV-1 et SDRPV-2, sans pour autant modifier l'expression membranaire du récepteur CD163, ni sa fonction sur le complexe hémoglobine-haptoglobine (Burkard et al., 2017).

La sialoadhésine est exprimée à la surface des macrophages de la rate, du foie, des ganglions lymphatiques, de la moelle osseuse, du côlon et des poumons. Elle est impliquée dans les interactions cellules-cellules via l'acide sialique et facilite les interactions cellules-pathogènes ce qui favorise l'endocytose des agents pathogènes sialylés comme le SDRPV (Zhang and Yoo, 2015). Ce récepteur peut être considéré comme étant un potentiel médiateur de l'entrée du SDRPV dans la cellule cible, mais n'est pas indispensable à l'attachement et/ou l'internalisation du SDRPV (Prather et al., 2013). Le récepteur CD151 semble être impliqué dans l'étape d'entrée du SDRPV (Shanmukhappa et al., 2007). Une surexpression de CD151 semble rendre des lignées cellulaires permissives aux infections par le SDRPV (Wu et al., 2014). La vimentine est impliquée dans l'infectiosité du SDRPV (Kim et al., 2006) et l'héparine-sulfate, dans l'initiation de l'attachement du SDRPV avec la cellule cible à travers l'interaction avec le complexe GP5-protéine M (Delputte et al., 2005). L'interaction entre le récepteur DC-SIGN (ou CD209) et le SDRPV induit l'expression de gènes proinflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes (Piñeyro et al., 2016).

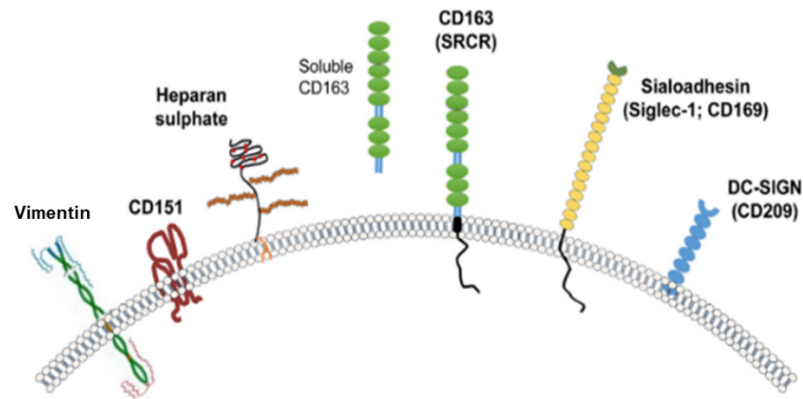


Figure 6 : Récepteurs cellulaires du SDRPV (Zhang and Yoo, 2015)

2.2.3.3 Cycle de réplication

Le SDRPV se multiplie dans le cytoplasme des macrophages et produit généralement un effet cytopathique (ECP) au bout de 24 h (Albina, 1997). Ce virus interagit via ses protéines d'enveloppe avec les récepteurs de type héparane-sulfate présents à la surface de la cellule hôte. Une interaction, plus stable, entre le SDRPV et la sialoadhésine, se met en place dans un second temps. Cette étape conduit à l'internalisation du virion dans la cellule hôte à travers un mécanisme actif d'endocytose mis en place par le biais de clathrines (figure 7). Un pH acide est nécessaire pour que la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la vésicule de l'endosome se produise. L'étape suivante consiste au désassemblage et au relargage du génome viral dans le cytoplasme de la cellule hôte. Au cours de cette étape, essentiellement médiée par le récepteur CD163, l'enveloppe virale fusionne avec l'endosome précoce et la particule virale est décapsidée. La réplication virale peut ensuite commencer. Le génome est alors traduit en pp1a et pp1ab qui sont maturées à travers une succession d'auto-clivage par des protéases internes. Les nsps sont assemblées pour former un complexe de réplication et de transcription ou *replication and transcription complex* (RTC). Le RTC débute la réplication virale avec la transcription du génome viral infectieux ARN (+) en brin complémentaire génomique ARN (-) et des ARNm (-) subgénomique. Les brins complémentaires génomiques ARN (-) vont servir de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes viraux infectieux ARN (+). Les ARNm (-) subgénomiques vont servir quant à eux de matrice pour la synthèse d'ARNm (+) subgénomique et vont coder les protéines structurales. Les génomes d'ARN (+) néoformés sont encapsidés, et après une étape de bourgeonnement, vont former de nouvelles particules virales infectieuses (Lunney et al., 2016). Le cycle de réplication s'achève par la libération de nouveaux virions dans l'espace extracellulaire par exocytose.

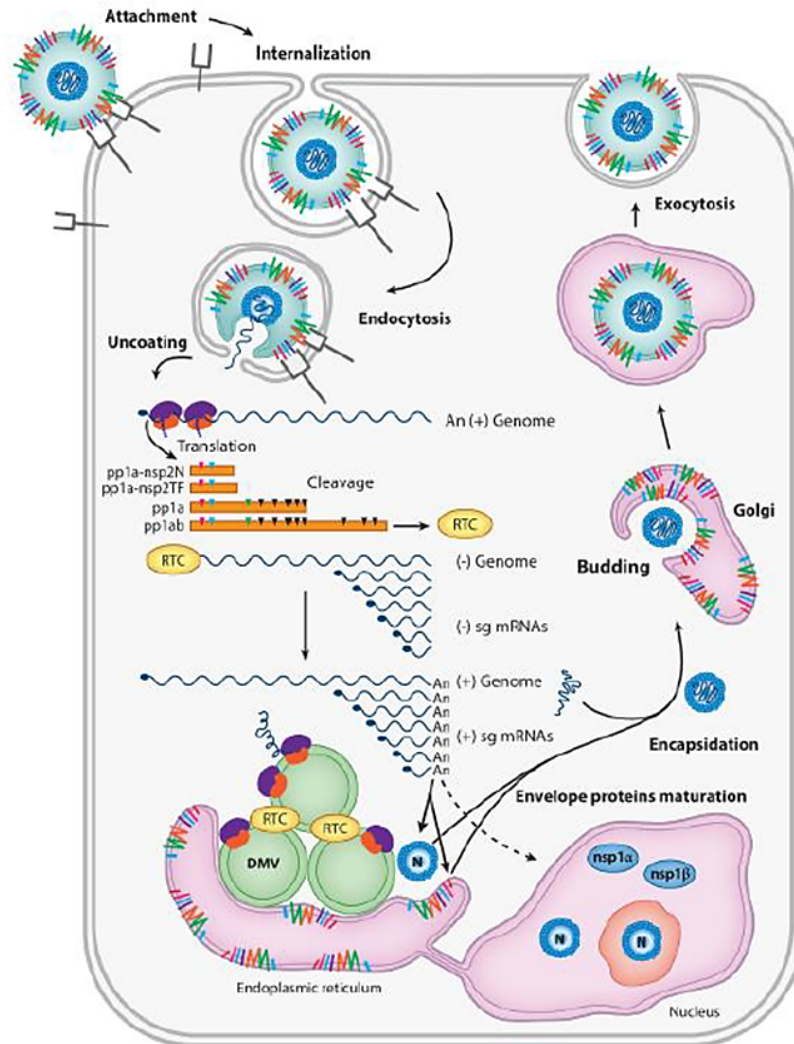


Figure 7 : Cycle de réplication des Arterivirus (Lunney et al., 2016). Après l'étape d'attachement aux récepteurs cellulaires, s'ensuit l'entrée virale médiée par endocytose et la décapsidation de la particule virale. Le génome est alors directement traduit en polyprotéines pp1a et pp1b. Ces protéines sont maturées par succession de clivages par des protéases internes. Les nsp sont assemblées en complexe de réplication et de transcription (RTC). Ce RTC débute la réplication virale avec une transcription du génome infectieux ARN (+) en brin complémentaire génomique ARN (-) et en ARNm (-) subgénomique. Le brin complémentaire génomique ARN (-) sert de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes viraux infectieux ARN (+) qui seront encapsidés pour former après une étape de bourgeonnement de nouvelles particules virales infectieuses.

2.2.4 Evolution génétique

La variabilité génétique est très importante entre les SDRPV-1 et SDRPV-2, mais aussi au sein même des deux espèces. Celle-ci est principalement due à des phénomènes fréquents de recombinaison et de mutation (substitution, insertion et délétion), qui peuvent entraîner des changements phénotypiques du SDRPV, comme l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte, la modification du tropisme cellulaire et l'altération de la pathogénicité (Bentley and Evans, 2018).

La recombinaison intervient durant la réplication virale. La co-infection d'une cellule hôte par au moins deux SDRPV d'une même espèce est la condition préalable pour les phénomènes de recombinaison (An et al., 2020). L'ARN polymérase ARN dépendante commute d'une molécule d'ARN (matrice du donneur) à une autre (matrice de l'accepteur) pendant la synthèse tout en restant liée à la chaîne d'acides nucléiques nouvellement formée. Ceci générera par la suite une molécule d'ARN à ascendance mixte. Cela aboutit donc à la formation d'un virus chimérique issu de génomes parentaux d'origine mixte. Les recombinants qui en résultent contribuent aux variations génétiques, à l'évolution du SDRPV et à la réduction de l'efficacité vaccinale (An et al., 2020).

Les mutations résultent de l'incapacité de l'ARN polymérase ARN-dépendante du SDRPV à corriger les fréquentes erreurs ponctuelles qui peuvent survenir durant la réplication de l'ARN viral. Le taux d'erreur dû à l'introduction de substitutions, de délétions et d'insertions est de $4,7$ à $9,8 \times 10^{-2}$ / site / an pour le SDRPV (Zhou et al., 2021). Une étude comparative de plusieurs séquences issues de 7 passages successifs chez le porc d'une souche SDRPV-2 a montré des ORF1b et ORF7 hautement conservés et un ORF5 très impacté par des divergences nucléotidiques et des mutations non-silencieuses (Chang et al., 2002).

2.3 Clinique et physiopathologie de l'infection à SDRPV chez le porc

2.3.1 Signes cliniques

Les porcs de tous les âges sont susceptibles d'être infectés par le SDRPV lorsqu'ils font partie d'un troupeau immunologiquement naïf vis-à-vis de ce virus. Les signes cliniques issus d'une infection par le SDRPV peuvent être très différents d'un élevage à l'autre. Cela peut aller d'un élevage sans signe clinique à un élevage avec des troubles persistants, ceci notamment en fonction du statut sanitaire du troupeau (présence de co-infections). Les symptômes usuellement rencontrés sont une anorexie, de la fièvre ($> 40^{\circ}\text{C}$), de la dyspnée et de la léthargie (tableau 2) (Albina, 1997; Balasuriya and Carossino, 2017). Pour les truies, le SDRPV peut provoquer des épisodes de troubles de la reproduction (avortement au troisième tiers de gestation, des morts-nés et une mortalité néonatale entre 20 et 100%, des mises-bas prématurées) et des problèmes respiratoires (éternuements, toux et dyspnée) (tableau 2). En post-sevrage, les porcs peuvent être sujets à de l'abattement, de l'anorexie ainsi qu'une détresse respiratoire lors de la période d'infection aiguë, et possèdent une sensibilité accrue aux surinfections (tableau 2 ; figure 8) (Albina, 1997; Balasuriya and Carossino, 2017).

Tableau 2 : Signes cliniques chez les porcs infectés par le SDRPV (d'après l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE)) ; (Albina, 1997; Balasuriya and Carossino, 2017)

Truies	Porcelets non sevrés	Porcelets sevrés
- Hyperthermie (> 40°C)	- Faiblesse	- Mortalité
- Perte d'appétit, dépression, léthargie, ataxie	- Léthargie, perte d'appétit	- Hyperthermie
- Signes respiratoires (toux, éternuement, dyspnée)	- Signes respiratoires (toux, éternuement, dyspnée)	- Faiblesse
- Cyanose (oreilles et vulve)	- Mortalité	- Perte d'appétit/anorexie
- Parésie / faiblesse	- Hyperthermie	- Signes respiratoires (toux, éternuement, dyspnée)
- Mortalité néonatale élevée (20 à 100%)	- Œdèmes sous cutanés	- Cyanose
- Avortements tardifs / mises bas prématurées (10 à 50%)	- Cyanose	- Retard de croissance
		- ↗ du risque de co-infections

2.3.2 Lésions pulmonaires (macroscopique et microscopique)

Les lésions pulmonaires macroscopiques chez les porcs mono-infectés par le SDRPV sont des lésions de pneumonie grises-brunes réparties en damier souvent localisées au niveau des lobes antérieurs du poumon (figure 8). Ces lésions sont souvent complexifiées ou masquées par des lésions issues d'infection bactérienne et/ou virale concomitantes (Saade et al., 2020a).

Les lésions pulmonaires microscopiques sont caractérisées par des hypertrophies et des hyperplasies pneumocytaires de type II, une infiltration septale par des cellules mononucléées et des exsudats alvéolaires (Opriessnig et al., 2002).

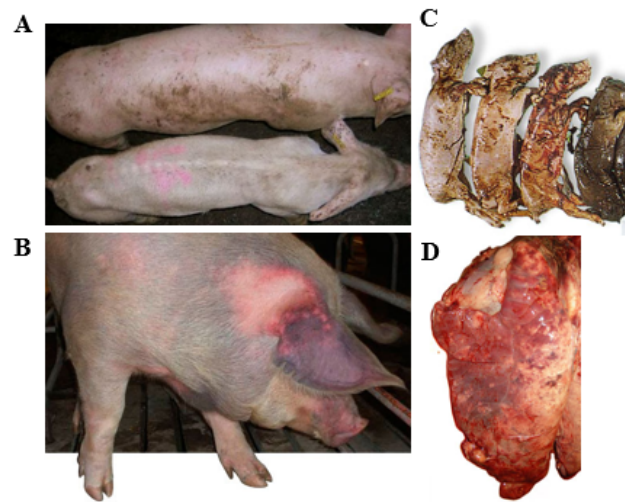


Figure 8 : Photographies des manifestations induites par une infection par le SDRPV. A) Porc anorexique (<http://www.pig33.com>). B) Cyanose des oreilles. C) Mort fœtale progressive sur une portée. D) Lésions de pneumonie sur un poumon de porc de 14 semaines d'âge (<http://www.3trois3.com>)

2.3.3 Virulence et sensibilité

La sévérité des signes cliniques induits lors du SDRP, peut varier en fonction de l'espèce virale (SDRPV-1 ou SDRPV-2), de la génétique et de l'âge du porc, du statut immunitaire de l'hôte et de la présence d'infections concomitantes.

Les signes cliniques sont similaires d'une espèce virale à l'autre, mais semblent souvent plus marqués pour le SDRPV-2 que pour le SDRPV-1. Une étude comparative de la pathogénicité des infections par le SDRPV-1 et le SDRPV-2 chez des porcelets a ainsi montré que le SDRPV-2 était plus pneumovirulent que le SDRPV-1, avec des signes cliniques plus marqués et une sévérité des lésions macroscopiques et microscopiques plus importante (Martínez-Lobo et al., 2011). Au sein d'une même espèce virale, la sévérité des signes cliniques peut être différente selon la souche de SDRPV. Une étude réalisée au sein de notre unité qui visait à comparer la souche SDRPV-1 Léna (type 1.3, dite hautement virulente ou HP) et la souche SDRPV-1 Finistère (type 1.1, faiblement virulente) a ainsi montré une pathogénicité accrue pour le type 1.3 comparativement au type 1.1, avec notamment une hyperthermie pendant environ deux semaines et entraînant la mort de 3/8 porcs (Renson et al., 2017). Cette différence de sévérité clinique a également été observée au sein des souches SDRPV-2 (Brockmeier et al., 2012). Pour les souches HP du SDRPV-2, l'éventail des signes cliniques semble être plus large, et elles affectent les reins, le foie et la rate, entraînant une forte morbidité (50-100%) et mortalité (20-100%). Les HP-SDRPV-2, qui ont émergé en Chine en

2006, présentent deux délétions distinctes dans la protéine nsp2, comparativement aux précédentes souches d'Amérique du Nord, qui pourraient jouer un rôle dans leur caractère hautement virulent (Li et al., 2016; Tong et al., 2007).

L'âge des animaux peut être un facteur impactant le degré de sensibilité à l'infection par le SDRPV. En effet, la virulence de l'infection SDRPV est nettement plus sévère et prolongée chez les jeunes porcelets âgés de 3 semaines d'âge, que chez les truies ou des porcs à l'engraissement de 16-20 semaines d'âge (Klinge et al., 2009). Par ailleurs, les niveaux de virémie et d'excrétion nasale du SDRPV étaient plus importants pour des porcs de 6-8 semaines d'âge que pour des porcs de 24 semaines d'âge (van der Linden et al., 2003).

La race des porcs (Large White, Pietrain ou Landrace), le statut sanitaire de l'hôte (porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés EOPS ou porcs conventionnels), ainsi que des infections concomitantes (bactéries et/ou virus) font également partie des facteurs influençant le degré de virulence de l'infection par le SDRPV (Butler et al., 2014; Lunney et al., 2016; Saade et al., 2020a).

2.4 Épidémiologie

2.4.1 Prévalence et conséquences économiques pour la filière porcine

Les SDRPV-1 et SDRPV-2 sont actuellement présents dans pratiquement tous les pays producteurs de porcs et le risque de propagations intercontinentales est réel et extrêmement préoccupant (figure 9). Aux Etats-Unis, des études sérologiques ont montré que 50% des troupeaux non vaccinés étaient séropositifs avec des prévalences pouvant atteindre plus de 70% en fonction des Etats (USDA-APHIS, 2009). En Europe, cette maladie touchait plus de 50% des élevages porcins présents dans les zones à forte densité porcine. Plus la densité de porcs est importante et plus le risque d'infection par le SDRPV est élevé (Alkhamis et al., 2017). Malgré tout, certains pays restent encore indemnes de cette maladie comme la Suède, la Norvège, la Finlande, l'Australie ou la Nouvelle-Zélande, notamment grâce à des politiques d'importations et des règles sanitaires très strictes.

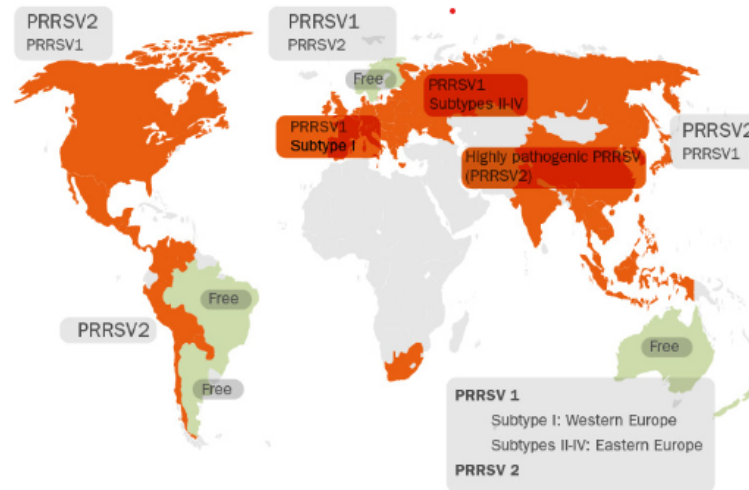


Figure 9 : Répartition géographique des deux espèces de SDRPV à travers le monde – <http://prcontrol.com>

En France continentale, la prévalence du SDRPV est très importante en Bretagne, où on rapporte environ 60% de prévalence (Fablet et al., 2012a) (figure 10). Les régions du Nord Est de la France sont également touchées par le SDRPV.

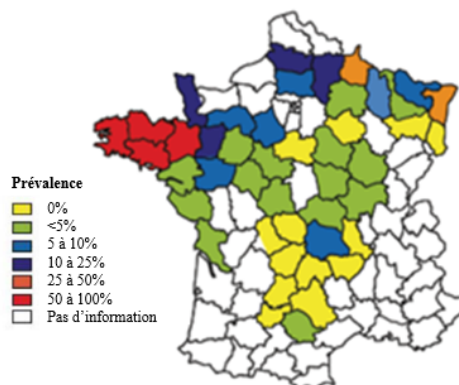


Figure 10 : Prévalences des infections à virus SDRP en France continentale (FNGDS, enquête 1998-2002, communication personnelle)

Au sein du SDRPV-1, au moins quatre sous-types ont été identifiés : Le type 1.1 prédominant en Europe de l'Ouest et les types 1.2, 1.3 et 1.4 prédominants dans les pays européens à l'Est de la Pologne (Shi et al., 2010). Le SDRPV-1 est également présent aux Etats-Unis (Fang et al., 2004), au Canada (Dewey et al., 2000), en Chine (Jiang et al., 2000), en Thaïlande (Thanawongnuwech et al., 2004a) et en Corée du Sud (Lee et al., 2010).

Le SDRPV-2 est subdivisé en neuf lignages (Shi et al., 2010). Les HP-SDRPV-2 se sont rapidement répandues en Asie de l'Est, du Sud et du Nord (ex : Bhoutan, Cambodge, Chine, Indonésie, Malaisie, Myanmar, Philippines, Russie, etc.) (Senthilkumar et al., 2018).

De nombreuses études ont examiné l'impact économique de l'infection SDRP sur les troupeaux de porcs reproducteurs et les porcs à l'engraissement (Nieuwenhuis et al., 2012). Chaque année, les producteurs de porcs américains perdent environ 600 millions de dollars à cause des épidémies de SDRPV (figure 11). Selon Neumann et al., 45% de la perte économique serait due à une baisse du gain moyen quotidien (GMQ) et de l'efficacité alimentaire des porcs en croissance, 43% résulteraient de la mortalité des porcs en croissance et 12% sont attribués aux pertes de reproduction (Neumann et al., 2005). En Europe, les performances des troupeaux étaient également affectées par l'infection à SDRPV, avec une perte moyenne par truie s'élevant à 126 euros par an (Nieuwenhuis et al., 2012). En Espagne, cette perte était évaluée à 105 euros par truie ou 11 euros par porcelet produit dans un élevage de reproduction (Nathues et al., 2017).

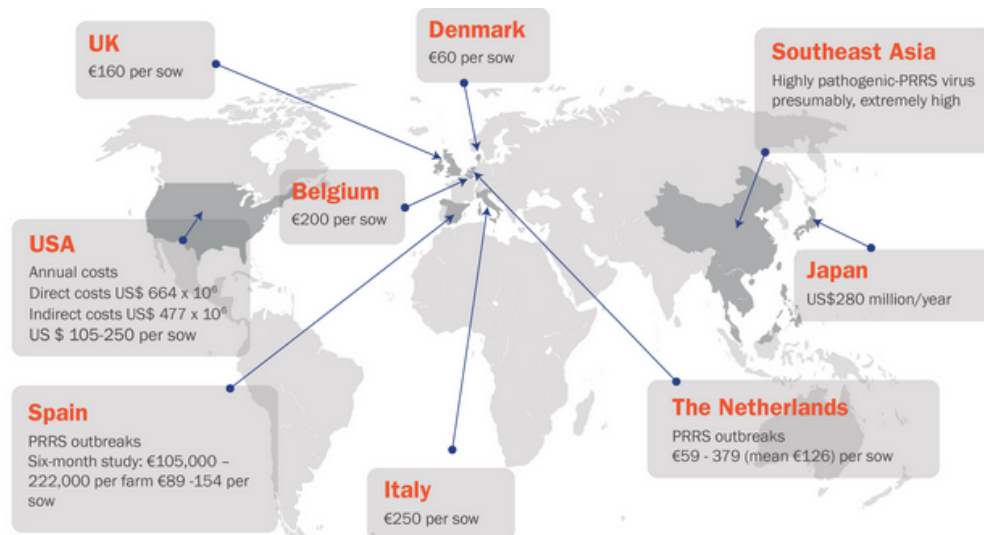


Figure 11 : Conséquences économiques du SDRP dans l'industrie porcine (Hipra, 2015)

2.4.2 Mode de transmission et persistance du SDRPV

2.4.2.1 Mode de transmission

Le porc (*Sus scrofa domesticus*) et le sanglier (*Sus scrofa*) sont les deux seules espèces à pouvoir être infectées par le SDRPV dans les conditions naturelles. Le virus est présent dans diverses sécrétions et excréments porcines, telles que, les aérosols, la salive, le sang, le sperme, les matières fécales, l'urine, le lait et le colostrum (Cho and Dee, 2006). La transmission virale entre animaux infectés et animaux sensibles peut se faire par contact direct ou par contact indirect (Bierk et al., 2001).

La voie de transmission principale du SDRPV est le contact direct. Cette transmission peut être soit horizontale, soit verticale. La transmission directe horizontale se fait à travers un contact « groin à groin » (via les sécrétions nasales ou la salive contaminée), ou plus rarement, via l'urine, les matières fécales ou par la semence contaminée. La dose minimale infectieuse du SDRPV chez le porc semble être comprise entre $10^{3.0}$ et $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL par voie nasale, entre $10^{4.6}$ et $10^{5.9}$ TCID₅₀/mL par voie orale et $10^{2.2}$ TCID₅₀/mL par voie parentérale (par l'intermédiaire de plaies cutanées, lors de la coupe de dents ou de la queue, ou d'aiguilles contaminées) (Hermann et al., 2005). Cette dose minimale infectieuse est donc dépendante de la voie d'exposition. La souche Lena (type 1.3) se multiplie plus fortement au niveau des muqueuses nasales que la souche Lelystad (type 1.1) favorisant la formation d'aérosols infectieux et vraisemblablement la transmission par voie aérienne (Frydas et al., 2015). La transmission directe verticale se déroule majoritairement pendant le dernier trimestre de gestation, via le franchissement par le SDRPV de la barrière placentaire de la truie vers le fœtus (Balasuriya and Carossino, 2017; Pileri and Mateu, 2016a). La transmission par contact indirect se fait à travers des fomites et des résidus contaminés (ex : matériel contaminé).

2.4.2.2 Les phases de l'infection par le SDRPV

L'infection par le SDRPV présente trois phases : (i) Une phase aiguë où le SDRPV se multiplie dans le tractus respiratoire inférieur et supérieur avec une virémie détectable à partir de 6 à 12 heures post-infection (hpi) ; (ii) Une phase de persistance du virus dans les organes lymphoïdes (amygdales, ganglions lymphatiques), avec un titre viral de plus en plus faible aux niveaux pulmonaire et systémique et des signes cliniques fortement atténués voire inexistant ; (iii) Une phase d'extinction qui correspond à l'arrêt de la multiplication virale dans les organes lymphoïdes. Cette dernière phase varie entre 3 semaines et 9 mois en fonction de l'individu (Lunney et al., 2016; Pileri and Mateu, 2016a; Wills et al., 2003). La persistance à long terme de l'infection est caractéristique de la famille des *Arteriviridae* (Plagemann and Moennig, 1992). Le SDRPV peut être détecté dans les urines jusqu'à 28 jpi (jours post inoculation), dans la matière fécale jusqu'à 38 jpi, dans la salive jusqu'à 48 jpi, dans le sperme jusqu'à 92 jpi et dans les amygdales pendant au moins 150 jpi (Allende et al., 2000; Bierk et al., 2001).

Au sein d'un élevage, les individus peuvent être infectés par le SDRPV de manière asynchrone lors de la phase aiguë de l'infection favorisant ainsi la persistance virale dans le

troupeau. L'introduction de nouveaux animaux sensibles au sein d'un élevage participerait à la relance de l'activité virale. La perte progressive de l'immunité protectrice des porcs qui peut apparaître dès le 5^{ème} mois post-infection, peut également faire persister le SDRPV dans l'élevage, avec une réinfection et une ré-excrétion virale (Albina, 1997; Bierk et al., 2001).

2.5 Défenses de l'hôte vis-à-vis du SDRPV

2.5.1 Modulation de l'immunité innée par le SDRPV

Le système immunitaire inné représente la première ligne de défense contre tous types d'infections. Cette immunité non spécifique fait intervenir des cellules que sont : les cellules « natural killer » (NK), les granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Concernant l'infection par le SDRPV, les macrophages pulmonaires ainsi que les cellules dendritiques sont essentiels dans la prévention de l'invasion virale dans la circulation sanguine et dans l'induction d'une immunité adaptative protectrice (Bordet et al., 2019).

Les cellules NK sont des cellules cytotoxiques qui participent à la destruction des cellules infectées de manière peu spécifique. Au cours des phases précoces d'infection, les cellules NK semblaient produire majoritairement l'IFN- γ . Une étude réalisée au sein de notre laboratoire a montré qu'une infection par la souche Lena (SDRPV type 1.3) induisait, 8 jpi, une importante quantité d'IFN- γ au niveau pulmonaire, comparativement à un autre souche moins virulente de SDRPV-1 (souche Finistère, type 1.1) (Renson et al., 2017). Lors d'une infection à SDRPV, la capacité cytotoxique des cellules NK semblait réprimée à travers une inhibition de la dégranulation cellulaire (Cao et al., 2013). De même, lors d'une infection à SDRPV-2, une diminution significative de l'activité cytotoxique des cellules NK avait été observée deux jours après l'infection, sans pour autant qu'il y ait un impact sur le nombre de cellules NK (Renukaradhya et al., 2010).

Au niveau cellulaire, la réponse immunitaire innée est enclenchée via la reconnaissance de l'ARN viral par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, les PRR (*pattern recognition receptors*). Il existe trois types de PRR : les récepteurs membranaires de type Toll (*Toll-like receptors*, TLR), les récepteurs de type Nod (*Nod-like receptors*, NLR) et les récepteurs cytoplasmiques de type RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors*, RLR). Deux types de signaux reflétant la perception d'une infection virale par la cellule ont

été mis en évidence. D'une part, les signaux extracellulaires qui résultent de l'infection d'une cellule voisine, pouvant être captés par les TLRs, et d'autre part, la présence de senseurs cellulaires, RIG-I et Mda5 (*melanoma differentiation-associated protein5*). En générale, les TLRs impliqués dans la détection des infections virales sont principalement les TLR3 et TLR7 et sont exprimés au niveau de l'endosome des macrophages ou des cellules dendritiques. L'activation de ces récepteurs va induire une cascade de signalisation qui va conduire à l'activation des facteurs de transcription IRF (*interferon regulatory factor*) -3, IRF-7 et NF- κ B (*nuclear factor κ B*), et à la transcription de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et les IFN-I (IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- ϵ , IFN- τ et IFN- κ). Une fois que les IFN-I sont sécrétés par les cellules infectées, ils peuvent se fixer sur le récepteur exprimé par les cellules avoisinantes (figure 12). Ce récepteur, qui est exprimé à la surface de la majorité des cellules de l'organisme, se compose de deux sous-unités : IFNAR (*type I interferon receptor*) 1 et IFNAR2. Son activation va induire une voie de signalisation appelée JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*). Deux kinases, JAK1 et Tyk2 qui sont associées à IFNAR1 et IFNAR2 vont assurer l'activation par phosphorylation des facteurs de transcription STAT1 et STAT2. Ces deux facteurs de transcription forment un hétérodimère qui va s'associer par la suite avec le facteur IRF9 pour former un complexe tripartite, ISGF (*interferon-stimulated gene factor*)-3. Le complexe ISGF3 va se fixer sur la séquence ISRE (*interferon-stimulated response element*) présente dans les promoteurs de transcription des gènes ISG (*IFN stimulated genes*) pour coder des protéines antivirales MxA (*myxovirus resistance protein A*), PKR (*protein kinase R*), OAS (*oligoadenylate synthetase*), ISG15, Viperin, Tetherin et IFITM (*interferon-inducible transmembrane*). Les ISGs sont les principaux effecteurs des IFNs pour favoriser un état antiviral dans les cellules voisines (McNab et al., 2015; Van de Sandt et al., 2012; Wu and Metcalf, 2020).

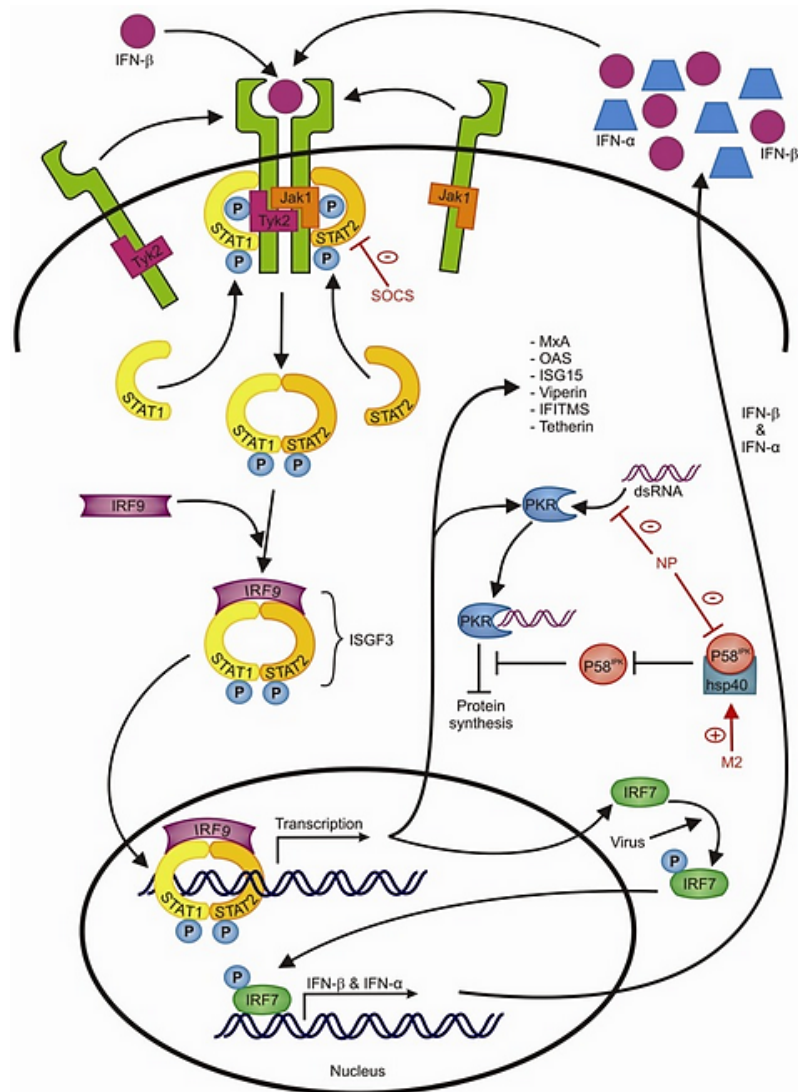


Figure 12 : Voie de signalisation induite par la production d'IFN-I et conduisant à la production de protéines antivirales (van de Sandt et al., 2012). L'IFN-β produit par les cellules infectées par l'agent viral se lie aux récepteurs de l'IFN, provoquant la phosphorylation de Tyk2 et Jak1. Ceci est suivi par la liaison et la phosphorylation de STAT1 et STAT2 qui forment ensuite un complexe avec IRF9. Ce complexe ISGF-3 induit l'expression de centaines de gènes régulés par l'IFN dont Mx1, Mx2, PKR, OAS, ISG15, Viperin et IFITM. La protéine exprimée PKR est activée lors de la reconnaissance de l'ARN viral, ce qui entraîne l'inhibition de la synthèse des protéines, y compris des protéines virales. La protéine IRF7 est phosphorylée en présence de l'agent viral, ce qui entraîne l'activation d'une boucle de rétroaction positive, provoquant la transcription de l'IFN-α et de l'IFN-β.

Le SDRPV est sensible aux IFN-I (Wang and Zhang, 2014). Un prétraitement des PAM et des MARC-145 avec de l'IFN-I (IFN-α ou -β) porcine a entraîné une réduction significative de la réplication du SDRPV (Buddaert et al., 1998; Overend et al., 2007). D'autre part, la réponse IFN-I vis-à-vis d'une infection à SDRPV est faible (Ke and Yoo, 2017). Ce virus semble donc capable de bloquer la synthèse d'IFN-I chez le porc (figure 13A). La suppression de l'IFN-I a été observée *in vitro* dans les cellules MARC-145 et les PAM infectés par le SDRPV (Ke and Yoo, 2017). Les protéines nsp1, nsp2, nsp11 et N du SDRPV sont des antagonistes de

l'induction des IFN-I (Ke and Yoo, 2017; Sun et al., 2012; Yang and Zhang, 2017). La nsp1a et la nsp1b vont inhiber considérablement l'expression de l'IFN- β en interférant sur la phosphorylation et la translocation nucléaire de l'IRF3 (Beura et al., 2010; Han and Yoo, 2014). La nsp2, comme la protéine N, inhibe, l'induction d'IFN-I en bloquant la phosphorylation et la translocation nucléaire de l'IRF3 (Ke and Yoo, 2017) et la production de l'ISG15 (Han and Yoo, 2014; Sun et al., 2012). La nsp11 va supprimer l'activation du promoteur de l'IFN- β et l'expression des gènes médiée par l'IRF3 (Shi et al., 2011).

En culture de PAM ou de MARC-145, le SDRPV est capable de moduler la voie de signalisation JAK/STAT conduisant à une réduction de l'expression des ISG tel que ISG15 et ISG56 (Wang and Zhang, 2014) (figure 13B). Les protéines du SDRPV impliquées dans cette interférence de la voie de signalisation JAK/STAT sont : nsp1 β , nsp7, nsp12, GP3 et N (Patel et al., 2010).

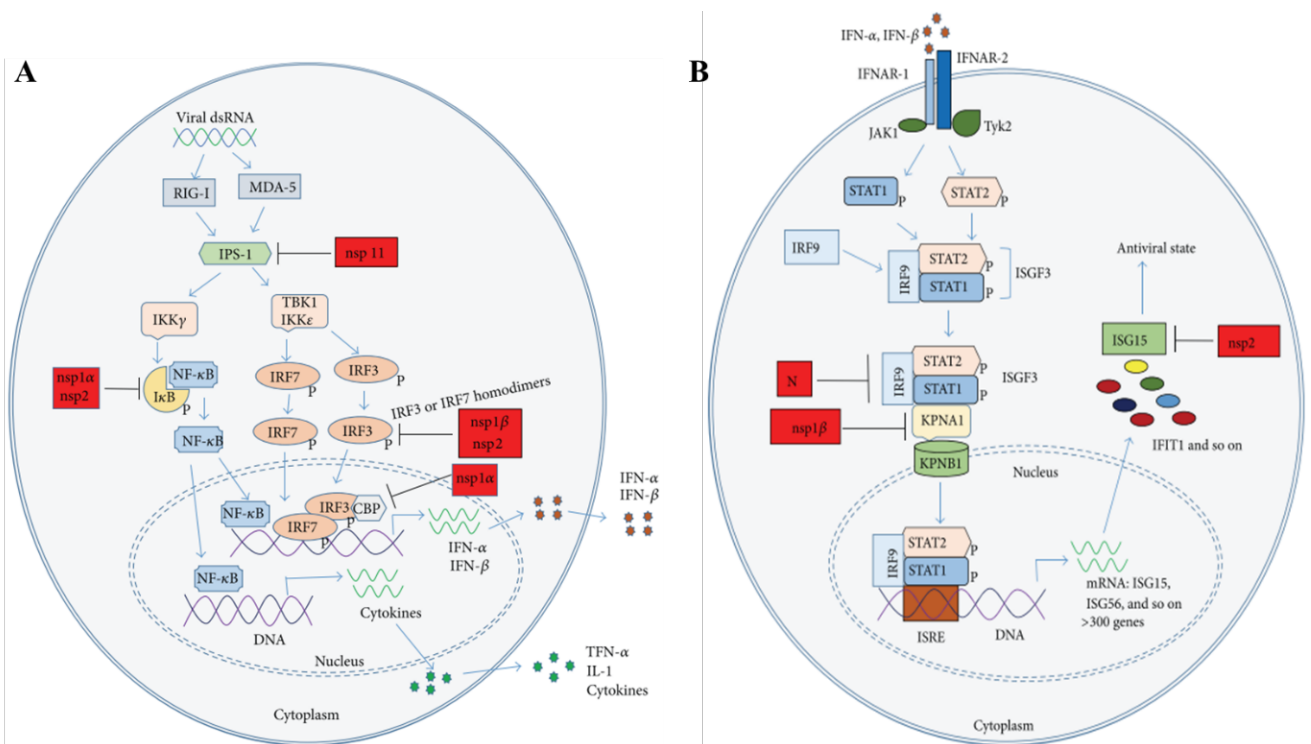


Figure 13 : **A)** Interférence dans la production d'IFN-I par les protéines du SDRPV. **B)** Interférence dans la voie de signalisation JAK-STAT par les protéines du SDRPV (Wang and Zhang, 2014). Le « P » indique une phosphorylation. Les blocs de couleur rouge indiquent les protéines du SDRPV connues pour inhiber les molécules de signalisation indiquées. A) nsp1 α inhibe l'association d'IRF3 avec CBP, renforce la dégradation de CBP (CREB-binding protein) et interfère avec la dégradation de I κ B. Nsp1 β , nsp2 inhibe la phosphorylation d'IRF3 et sa translocation nucléaire. B) Nsp1 β inhibe la translocation nucléaire d'ISGF3 en induisant la dégradation de KPNA1, qui est essentielle à la médiation de l'importation nucléaire d'ISGF3. La protéine N inhibe également la translocation nucléaire d'ISGF3. Nps2 réduit la production et la conjugaison d'ISG15 via son activité de débiquitination.

Les effets des IFN-I sur la réponse de l'hôte vis-à-vis d'une infection ne se limitent pas à la réponse antivirale. Au cours des infections virales, l'IFN-I va agir sur les cellules dendritiques

pour favoriser la transmission de signaux aux lymphocytes T, lymphocytes B et aux cellules NK pour une immunité protectrice (McNab et al., 2015). Ces cytokines peuvent néanmoins avoir un effet délétère sur l'hôte lors d'induction de réactions inflammatoires « débridées » pouvant conduire à de graves lésions tissulaires (Tomasello et al., 2014).

Outre l'inhibition de la production des IFN-I, le SDRPV semble être capable de réguler d'autres cytokines (figure 14), mais les études portant sur ce sujet apparaissent contradictoires. En effet, le SDRPV semble réduire la production de TNF- α (cytokine pro-inflammatoire, sécrétée par les cellules NK, les cellules phagocytaires et les lymphocytes T) mais d'autres études ont indiqué le contraire (Aasted et al., 2002; Ait-Ali et al., 2007; Miguel et al., 2010). Ces contradictions sont possiblement dus à des mutations ou délétions dans la protéine nsp2, protéine la plus variable du génome du SDRPV (Chen et al., 2010). Par ailleurs, le SDRPV augmenterait légèrement la production d'IL-6 (cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les macrophages et les lymphocytes T) (Liu et al., 2009; Peng et al., 2009; Sánchez-Carvajal et al., 2020; van Gucht et al., 2003). Ces différents effets sont potentiellement dus à l'espèce de SDRPV et aux niveaux de virulence des souches (An et al., 2020). L'IL-10 est une cytokine pléiotrope aux propriétés régulatrices pouvant avoir un rôle important dans l'immunomodulation du SDRPV. *In vitro*, ce virus est capable d'induire une augmentation de l'expression de l'IL-10 à partir de 12 hpi (Chang et al., 2008; Genini et al., 2008). Il semblerait que ce soit la protéine N du SDRPV qui soit capable d'augmenter l'expression de la cytokine IL-10 (Yu et al., 2017). L'induction de TGF- β (*transforming growth factor beta*), semble être différente selon l'espèce virale. En effet, une infection à SDRPV-1 ne semble pas capable d'induire la production de TGF- β (Silva-Campa et al., 2010), contrairement à l'infection à SDRPV-2 (Nedumpun et al., 2018; Silva-Campa et al., 2010). Le SDRPV-2 est capable d'induire la prolifération importante de lymphocytes Treg (Nedumpun et al., 2018).

Au final, la fonction modulatrice du SDRPV sur le système immunitaire de l'hôte est potentiellement due à une action coordonnée médiée par l'IL-10, le TGF- β et la forte production de lymphocytes Treg (Lunney et al., 2016).

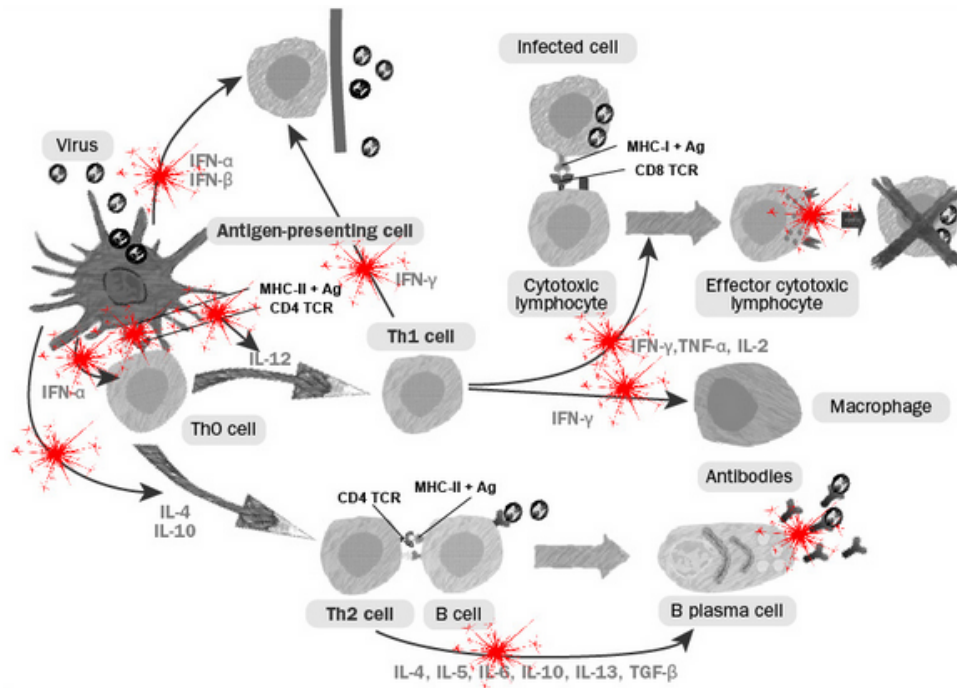


Figure 14 : Dérégulation du système immunitaire de l'hôte suite à une infection par le SDRPV (The book for PRRS knowledge, HIPRA, 2016)

2.5.2 Immunité adaptative

2.5.2.1 Réponse à médiation humorale

La réponse à médiation humorale implique des immunoglobulines (Ig) capables d'activer différents mécanismes effecteurs anti-viraux. Lors d'une infection par le SDRPV, des anticorps dits non neutralisants sont produits en premier, suivis d'anticorps dits neutralisants.

2.5.2.1.1 Les anticorps non neutralisants

Les anticorps anti-SDRPV qui apparaissent durant la phase précoce de l'infection ne participent pas à la neutralisation du virus. Les protéines N, nsp1, nsp2 et nsp7 sont hautement antigéniques et sont les cibles des anticorps non neutralisants (Rahe and Murtaugh, 2017). Dans les matrices « fluide oral » et « sérum », les IgM anti-SDRPV sont détectables au bout de 7 jpi avec un pic de détection entre 14 et 21 jpi, jusqu'à ne plus être détectables à partir de 40 jpi (Rotolo et al., 2018). Les IgG anti-SDRPV sont détectables entre 9 et 10 jpi et atteignent un pic de détection entre 21 et 28 jpi et leur niveau de détection reste élevé pendant la phase de persistance de l'infection. Les IgA anti-SDRPV sont détectables à partir de 7 jpi. Ces anticorps vont agir contre les protéines N, M et GP5 (Loving et al., 2015). La plupart des

kits de sérologie de type ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) spécifique du SDRPV vont détecter majoritairement les anticorps anti-protéine N.

2.5.2.1.2 Les anticorps neutralisants

Les anticorps neutralisants sont détectables aux alentours de 28 – 42 jpi. Les protéines GP3, GP4, GP5 et M sont les cibles de ces anticorps (Darwich et al., 2010). Les anticorps neutralisants anti-SDRPV bloquent l'infection en empêchant l'interaction du virus avec les récepteurs présents à la surface des macrophages (Delputte et al., 2004). Ils induisent une protection efficace contre les souches homologues, mais moindre contre des souches hétérologues (Lopez et al., 2007; Osorio et al., 2002). Robinson et al., ont montré, après un transfert passif (inoculé dans la cavité péritonéale), que des immunoglobulines purifiées issues de truies infectées à répétition par des SDRPV-2 semblaient protéger à 96% contre un challenge avec un SDRPV-2 et à 87% contre un challenge avec un SDRPV-1 (Robinson et al., 2018). Par contre, les immunoglobulines dépourvues d'activité neutralisante n'ont eu aucun effet sur l'infection virale.

2.5.2.2 Réponse à médiation cellulaire

Les porcs pourraient cependant contrôler l'infection en absence d'anticorps neutralisants (Rahe and Murtaugh, 2017). Les lymphocytes T jouent un rôle essentiel dans de nombreux aspects de l'immunité anti-SDRPV. En effet, les lymphocytes T vont permettre l'activation des lymphocytes B, la régulation de l'inflammation, la production de cytokines et ont une fonction effectrice cytotoxique leur permettant de détruire les cellules infectées par le SDRPV (Loving et al., 2015). Cette réponse à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ est tardive.

Une diminution substantielle et transitoire des lymphocytes T CD4⁺ se produit dans le sang environ 3 à 7 jpi, avec un retour à un niveau basal 7 à 14 jpi (Loving et al., 2015) (figure 15).

Une augmentation de la population de lymphocytes T CD8⁺ est généralement observée 4-5 semaines après l'infection à SDRPV (Loving et al., 2015). Ces lymphocytes T CD8⁺ sont généralement plus nombreux au niveau pulmonaire, comparativement aux lymphocytes CD4⁺ (Samsom et al., 2000; Tingstedt and Nielsen, 2004). Une augmentation des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺/CD8⁺ est observée dans les tissus lymphoïdes lors d'une infection à SDRPV (Darwich et al., 2010). Il a été observé par analyse ELISPOT (*Enzyme-Linked ImmunoSPOT*)

IFN- γ sur des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), que la production de cellules sécrétrices d'IFN- γ (IFN- γ -SC) après infection ou vaccination est 3 à 4 fois inférieure à celle obtenue avec d'autres virus porcins, tels que le virus de la maladie d'Aujeszky (ou virus de la pseudorage) (Darwich et al., 2010). L'examen des sous-populations cellulaires impliquées dans la réponse IFN- γ semble indiquer que cette cytokine est principalement produite par les cellules T CD4⁺/CD8⁺ ou dans une moindre mesure par les cellules CD4⁻/CD8⁺ (Meier et al., 2003).

Les IFN-I, outre leur action au niveau de l'immunité innée, peuvent également réguler la réponse à médiation cellulaire directement par l'intermédiaire des IFNAR présents à la surface des cellules T (Ke and Yoo, 2017). Ainsi, les IFN-I peuvent moduler la survie, la prolifération, la sécrétion d'IFN- γ et la fonction cytotoxique des lymphocytes T. Du fait de la faible induction de la réponse immunitaire innée antivirale au cours de l'infection SDRPV, les réponses adaptatives à médiation cellulaire seront par conséquent, plus faibles et plus lentes, avec notamment une production d'IFN- γ tardive.

Un déséquilibre de la balance Th1/Th2 a pu être observé au cours de l'infection SDRPV-2, suite à l'induction de la production d'IL-10 et le blocage des cytokines IFN- γ , TNF- α et IL12p40 (Liu et al., 2016). La souche chinoise HP-SDRPV-2 serait capable quant à elle de réduire fortement la réponse Th17 chez des porcs infectés, ce qui peut favoriser les surinfections bactériennes (Zhang et al., 2016). L'effet semble être souche-dépendant, car une souche SDRPV non-HP n'a pas suscité la même réponse.

Les lymphocyte T cytotoxique (CTL) n'ont pas de rôle fonctionnel important dans le contrôle de la phase aiguë de l'infection (Lohse et al., 2004) probablement à cause de l'absence d'exacerbation de l'infection à SDRPV par déplétion temporaire en LT CD8⁺. La prolifération des CTL mémoires a été observée à 14 jpi, mais l'activité des CTL n'a été détectée qu'à partir de 49 jpi (Costers et al., 2009) (figure 15).

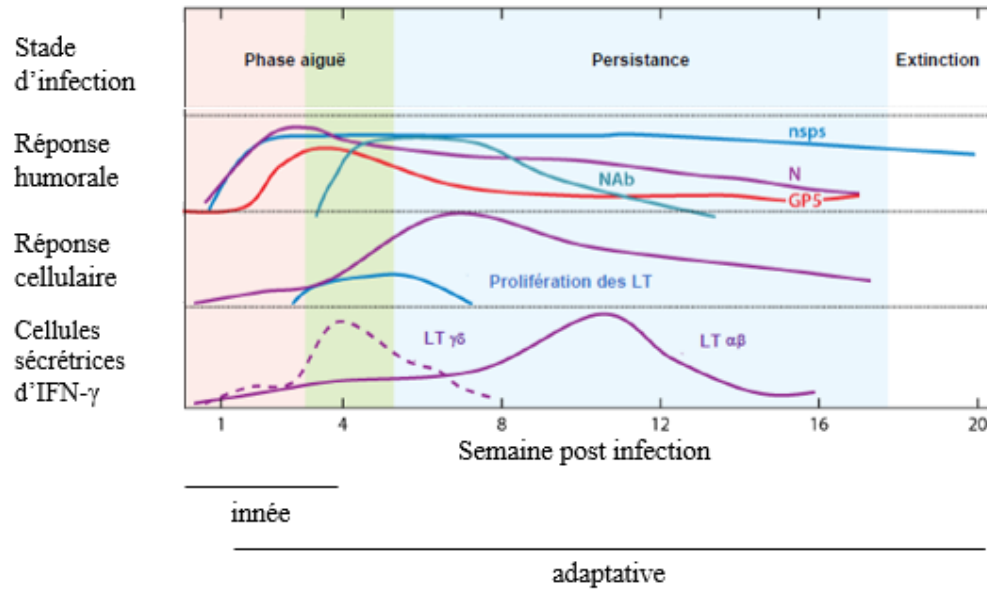


Figure 15 : Réponses adaptatives induites chez le porc au cours d'une infection SDRPV (adapté de Lunney et al., 2016)

2.6 Prévention et contrôle

L'infection par le SDRPV est responsable de lourdes pertes économiques. La biosécurité est un des moyens clés pour la prévention. Ces mesures, pouvant être externes ou internes, sont destinées, respectivement, à empêcher l'introduction d'agents pathogènes dans le troupeau et à réduire la propagation de ces pathogènes si l'élevage est contaminé (Food and Agriculture Organization, 2010). La lutte contre le SDRPV repose également sur son contrôle et son élimination au sein des troupeaux infectés.

2.6.1 Contrôle et élimination

Le contrôle du SDRP se définit comme l'absence de signes cliniques liés à l'infection et se confirme par un dépistage sérologique (ELISA) ou virologique (RT-PCR). Plusieurs stratégies de contrôle vis-à-vis du SDRPV existent (Berton, 2011).

2.6.1.1 Stabilisation des troupeaux

L'absence de signes cliniques et de transmission verticale du virus caractérisent un élevage stable. Les méthodes de stabilisation sont mises en place dans des régions ayant une forte prévalence en SDRPV, comme par exemple la Bretagne en France.

Le programme McRebel signifie « *Management changes to reduce exposure to bacteria to eliminate losses* » [changements apportés à la gestion pour réduire l'exposition aux bactéries et pour en éliminer les pertes] (McCaw, 1995). Il inclut des mesures de limitation des adoptions, des déplacements d'animaux entre les salles et l'euthanasie des porcelets présentant des signes de maladies/de faiblesse (McCaw, 1995).

La méthode de dépeuplement/repeuplement partielle ou modèle LCH (*load, close, homogenise* en anglais, ou entrée, fermeture et homogénéisation en français) est basée sur l'immunité des animaux pour éliminer le SDRPV de l'élevage (Rathkjen and Dall, 2017). Ce processus participe à la stabilisation du statut du SDRPV au sein du troupeau reproducteur avant que l'introduction de nouveaux animaux négatifs vis-à-vis du SDRPV ne se fasse (Linhares, 2013; Linhares et al., 2015). Cette stratégie peut être une alternative au programme McRebel (Rathkjen and Dall, 2017).

La vaccination vise également à contrôler le SDRP, réduire les pertes économiques liées à cette maladie et idéalement stopper la transmission de ce virus (voir partie 2.6.2).

2.6.1.2 Eradication

L'éradication du SDRPV, qui fait souvent suite à la stabilisation, est difficile et nécessite beaucoup de temps et d'argent (Berton et al., 2017). Cette méthode de lutte contre le SDRPV est mise en place principalement dans les régions à faible prévalence de l'infection. Elle est envisageable dans les zones de fortes densités porcines mais un risque important de recontamination existe alors.

La fermeture du troupeau consiste à interrompre l'introduction des femelles et mâles de renouvellement arrivant dans un troupeau reproducteur pendant au moins 6 mois, le temps que les animaux infectés ou vaccinés de l'élevage finissent par éliminer spontanément le SDRPV (Torremorell M et al., 2003).

L'élimination des animaux précédemment exposés au SDRPV a été proposée comme un moyen d'éliminer l'agent pathogène des exploitations infectées. Cette stratégie est connue sous le nom de « test and removal » (Dee et al., 2001). Des études de terrain consistaient à soumettre l'ensemble du troupeau reproducteur à un test sérologique (ELISA) ou un test virologique (PCR) et à retirer immédiatement les animaux positifs de l'exploitation (Dee and Molitor, 1998; Dee et al., 2000). L'inconvénient de cette méthode coûteuse est le fait qu'elle ne puisse être appliquée qu'au sein d'élevages présentant une faible séroprévalence vis-à-vis du SDRPV et qui ne pratiquent pas la vaccination, compte tenu de l'impossibilité de

discriminer les anticorps induits par le SDRPV ou par des anticorps post-vaccinaux (Dee et al., 2001).

La dépopulation et la repopulation de l'ensemble du troupeau est le moyen le plus efficace d'éliminer le SDRPV d'un troupeau. Cependant, la perturbation de la production a un coût financier important (Perez et al., 2015).

2.6.2 Vaccination

La vaccination est l'une des stratégies couramment utilisées pour lutter contre le SDRPV, parallèlement aux mesures de gestion et de biosécurité. A l'heure actuelle, plusieurs vaccins commerciaux atténués (vaccins vivants modifiés, ou *modified-live vaccines* MLV en anglais) ou inactivés, basés sur les souches SDRPV-1 et SDRPV-2, sont disponibles (Pileri and Mateu, 2016b). D'autres stratégies vaccinales sont en cours de développement (vaccins recombinants construits par génétique inverse, vaccins ADN, etc.). L'objectif principal de la vaccination est de réduire les signes cliniques, de diminuer la répllication et l'excrétion virales et de protéger les porcs contre l'infection. Au niveau de la population, la vaccination va permettre de contrôler le SDRPV, réduire les pertes économiques associées à la maladie et arrêter la transmission du virus. Les stratégies de vaccination avec un MLV sont actuellement prédominantes.

2.6.2.1 Vaccins vivants atténués

Les vaccins MLV anti-SDRPV sont largement utilisés depuis près de trente ans (tableau 3) et constituent les principaux vaccins commerciaux capables d'induire une réponse immunitaire protectrice contre un virus homologue et réduire les signes cliniques et l'excrétion virale lors d'une infection par un virus hétérologue (Zhou et al., 2021).

Tableau 3 : MLV contre le SDRPV disponibles dans le commerce (d'après Zhou et al., 2021)

Vaccins	Souches parentales	Espèces virales	Producteurs
Ingelvac PRRSFLEX® EU	94881	PRRSV-1	Boehringer Ingelheim
ReproCyc® PRRS EU	94881	PRRSV-1	Boehringer Ingelheim
Pyrsvac-183®	All-183	PRRSV-1	Syva
Unistrain® PRRS	VP-046 BIS	PRRSV-1	Hipra
Amervac® PRRS	VP-046	PRRSV-1	Hipra
Porcilis® PRRS	DV	PRRSV-1	MSD Animal Health
Suvaxyn® PRRS MLV	96V198	PRRSV-1	Zoetis
Prevacent® PRRS	RFLP 184	PRRSV-2	Elanco
Ingelvac PRRS® MLV	VR-2332	PRRSV-2	Boehringer Ingelheim
PRIME PAC® PRRS+	Neb-1	PRRSV-2	MSD animal Health
Ingelvac PRRS® ATP	JA-142	PRRSV-2	Boehringer Ingelheim
Fostera®PRRS	P129	PRRSV-2	Zoetis

Actuellement, presque tous les MLV disponibles dans le commerce ont été atténués par passages successifs sur lignées cellulaires comme les MARC-145, CRL11171 et CRL2621a (Nan et al., 2017). Les cellules PK (*porcine kidney*) ou BHK (*baby hamster kidney*), modifiées pour exprimer la molécule porcine CD163, ont également été développées pour l'atténuation du SDRPV et la production de vaccins (Calvert et al., 2007; Zhou et al., 2021). Les bases moléculaires de l'atténuation restent encore mal connues.

Les MLV infectent les porcs et sans induire de signes cliniques (si ce n'est une courte hyperthermie). Parallèlement, ils amplifient la quantité d'antigène disponible pour induire une réponse immunitaire chez les porcs. Etant donné que la réplication du MLV imite celle du virus sauvage, la réponse immunitaire de l'hôte ressemble à celle qui se produit après une infection virale naturelle, avec notamment une apparition tardive de cellules sécrétrices d'IFN- γ et d'anticorps neutralisants (Zhou et al., 2021). Des études évaluant l'efficacité de la vaccination MLV-1 ont montré, une diminution des cas infections par le virus sauvage de SDRPV (Stadejek T et al., 2005) et une atténuation des signes cliniques, comparativement à des animaux non vaccinés (Martelli et al., 2009). Par ailleurs, il a été montré au sein de notre laboratoire une réduction très significative de la transmission du SDRPV chez des porcs vaccinés (Rose et al., 2015).

La bonne efficacité vaccinale des MLV anti-SDRP montrée en conditions expérimentales semble malheureusement difficile à atteindre en conditions de terrain. L'une des explications

possibles de cette divergence concerne les anticorps d'origine maternelle (AOM), présents chez les porcelets nés dans les troupeaux infectés et absents chez les porcs EOPS utilisés dans les essais expérimentaux. En effet, une étude réalisée au laboratoire et menée sur le terrain avec un MLV-1 avait indiqué que des titres élevés en anticorps neutralisants d'origine maternelle (ANOM), au moment de la vaccination des porcelets, pouvaient abroger pendant 4 semaines la réplication de la souche vaccinale, bloquer l'induction de la réponse cellulaire spécifique du SDRPV et réduire le taux d'anticorps totaux et neutralisants (Fablet et al., 2016b). Une étude ultérieure avait mis en évidence qu'après challenge SDRPV, des porcelets vaccinés avec un fort taux d'ANOM présentaient une virémie équivalente aux porcelets non vaccinés et challengés SDRPV (Renson et al., 2019). Ainsi, la présence d'ANOM au moment de la vaccination représenterait un facteur important pouvant expliquer l'efficacité vaccinale limitée des MLV anti-SDRP sur le terrain.

Outre les anticorps d'origine maternelle, cette même étude a suggéré que des niveaux élevés d'IFN- α au moment de la vaccination MLV pourrait également affecter l'efficacité des MLV-1 sur le terrain (Renson et al., 2019). En 2017, il avait en effet été montré que l'induction d'IFN- α par un vecteur adénoviral (Ad5-pIFN- α) inhibait complètement la réplication d'un MLV-2 et abrogeait l'induction des réponses immunitaires post-vaccinales (Brockmeier et al., 2017). L'efficacité des MLV peut également être altérée lors de co-infections. En effet dans un contexte de vaccination MLV-2 et co-infection SDRPV-2/Mhp, l'infection bactérienne pouvait diminuer le taux de cellules sécrétrices d'IFN- γ chez les porcs vaccinés MLV-2 et co-infectés SDRPV-2/Mhp, comparativement aux porcs vaccinés et mono-infectés SDRPV-2 (Park et al., 2014). L'efficacité d'un MLV-2 pouvait être également diminuée chez des porcs co-infectés PCV2/SDRPV-2 (Opriessnig et al., 2006b).

Le modèle de vaccination homologue est défini, après la vaccination, par d'un challenge avec une souche SDRPV dérivée de la souche vaccinale ou qui est génétiquement très proche de cette dernière. Le modèle de vaccination hétérologue est défini, après la vaccination, par un challenge avec une souche SDRPV génétiquement distante de la souche vaccinale, par exemple, une souche d'une autre espèce, d'un autre sous-type ou d'une autre lignée (Chareerntanakul, 2012; Montaner-Tarbes et al., 2019; Nan et al., 2017). Bien qu'efficaces vis-à-vis des souches homologues, les MLV ne semblent présenter qu'une protection partielle vis-à-vis des souches hétérologues d'un point de vue clinique et virologique. Une étude expérimentale a montré qu'un MLV-2 pouvait fournir une protection complète contre un SDRPV-2 homologue et une protection partielle contre un SDRPV-2 hétérologue (Li et al., 2014), alors qu'un MLV-1 ne permettait pas de protéger contre un challenge SDRPV-2 (Oh et

al., 2019). Par conséquent, il semblerait qu'en terme de protection hétérologue, les MLV-2 semblent être plus performants que les MLV-1.

Si les MLV anti-SDRP restent globalement efficaces, leur utilisation peut cependant poser des problèmes d'innocuité, ceci en particulier du fait de leur instabilité génétique pouvant mener à une perte de leur atténuation et à un possible phénomène de réversion (Zhou et al., 2021). La réversion par mutation des souches vaccinales peut provoquer de l'expression clinique, tant reproductive que respiratoire, et affecter les performances de croissance (Eclercy et al., 2021). Ainsi, des souches partageant une grande similarité nucléotidique avec la souche vaccinale JXA1-2 dérivée du HP-SDRPV-2 ont été isolées et sont capables de provoquer une forte fièvre et une mortalité chez des porcs inoculés, ce qui indique une réversion vers la virulence (Jiang et al., 2015). Au sein de notre laboratoire, il a été mis en évidence qu'un nombre limité de passages d'une souche MLV-1 chez le porc permettait une adaptation rapide, voire une perte d'atténuation du vaccin, conduisant à la manifestation de signes cliniques (Eclercy et al., 2021). Le retour à la virulence d'une souche vaccinale peut également être due à des mécanismes génétiques tels que la recombinaison. Une autre étude réalisée au sein de notre unité a montré que la recombinaison entre deux MLV-1 sur le terrain a conduit à obtenir une souche atypique surpassant les capacités des deux souches parentales au niveau de l'excrétion nasale, de la virémie ainsi que de la transmission chez des porcs en croissance (Eclercy et al., 2019). Des phénomènes de recombinaison entre MLV et SDRPV sauvages ont également pu être observés (Wenhui et al., 2012).

2.6.2.2 Vaccins inactivés

Les vaccins inactivés, aussi nommés « killed vaccine » (KV), sont commercialisés dans plusieurs pays de l'Union Européenne, dont la France. Ce n'est que depuis 2005 que ces vaccins sont disponibles aux Etats-Unis en raison de leur efficacité jugée trop faible (Nan et al., 2017). Ces vaccins ne sont autorisés que chez les truies pour prévenir les troubles de la reproduction liés à l'infection par le SDRPV. Plusieurs études ont mis en avant les faibles performances des KV contre les SDRPV sauvages, indiquant l'absence de production détectable d'anticorps spécifiques du SDRPV (anticorps neutralisants ou non) (Kim et al., 2011) et une réponse à médiation cellulaire très faible (Bassaganya-Riera et al., 2004; Piras et al., 2005). Toutefois, il convient de noter que l'administration de KV contre le SDRPV a conféré certains avantages aux animaux précédemment infectés par le virus sauvage, tels

qu'une augmentation de la production d'anticorps et des réponses à médiation cellulaire (Bassaganya-Riera et al., 2004) (Kim et al., 2011). Contrairement aux MLV, les vaccins KV sont considérés comme sûrs (Charentantanakul, 2012).

2.6.2.3 Nouvelles approches vaccinales

Les vaccins à ADN offrent de nouvelles perspectives pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies d'origine bactérienne et virale. Cette méthode consiste à transférer un plasmide codant un ou plusieurs gènes d'intérêt dans les cellules de l'hôte *in vivo*. Les vaccins ADN vis-à-vis du SDRPV sont administrés chez le porc par voie intradermique ou intramusculaire (Opriessnig et al., 2021). L'immunisation de porcs avec la protéine GP5, seule ou en combinaison avec d'autres protéines structurales telles que la GP3 (Du et al., 2012) ou M (Jiang et al., 2009) a conduit à une protection homologue ainsi qu'une production détectable d'anticorps neutralisants le SDRPV (Du et al., 2012; Tang et al., 2014). Cette nouvelle approche de vaccination contre le SDRPV nécessite encore des étapes de développement mais elle semble être prometteuse en tant que méthode complémentaire pour « booster » la protection induite par les MLV (Nan et al., 2017).

La génétique inverse peut constituer un outil pour la construction de souches vaccinales chimériques qui permettraient une meilleure protection croisée vis-à-vis de souches SDRPV hétérologues (Nan et al., 2017). Des expériences de construction de clones d'ADN complémentaires infectieux ont permis d'obtenir plusieurs virus chimériques contenant des gènes codant pour la protéine GP3 (connue pour induire une production d'anticorps neutralisants) provenant de six souches différentes de SDRPV (Zhou et al., 2012). Cette même équipe a réalisé un brassage des gènes codant pour les protéines GP4 et M issus de différents virus parentaux pour créer des virus chimériques et ainsi permettre d'augmenter le taux d'anticorps capables de neutraliser des souches SDRPV hétérologues (Zhou et al., 2013). Une autre stratégie vaccinale consiste à utiliser des vecteurs pour exprimer des protéines du SDRPV. Un premier système d'expression est celui du Baculovirus exprimant les protéines GP5 et GP3 du SDRPV. Après un test *in vivo* chez la truie, une protection uniquement partielle a été notée contre les souches SDRPV homologues (Plana Duran et al., 1997).

D'autres part, des vecteurs viraux de type Adénovirus et Poxvirus déficients ou non pour la réplication virale et dont le génome viral code pour des protéines structurales du SDRPV ont été testés (Nan et al., 2017). Des souris immunisées avec des adénovirus recombinants exprimant GP5 seule ou en association avec GP3 et/ou GP4 ont montré une forte production

d'anticorps neutralisants ainsi qu'une forte réponse lymphocytaire dirigée contre les protéines structurales du SDRPV (Jiang et al., 2008).

La vaccination par voie orale à travers l'ingestion de plantes transgéniques qui expriment des protéines structurales du SDRPV a entraîné une efficacité limitée chez le porc même si une réduction de la virémie était observée (Renukaradhya et al., 2015).

3 L'INFLUENZA PORCIN

3.1 Découverte

En 1919, il a été signalé, pour la première fois, la présence de symptômes respiratoires graves chez les porcs aux Etats-Unis (Koen, 1919). D'importantes disparités cliniques avec d'autres maladies porcines connues à cette époque telles que la peste porcine classique, la nécrobacillose ou l'entérite nécrotique ont été observées. Cette maladie a été décrite comme « grippe », sur la base des similitudes cliniques avec la maladie qui avait dévasté la population humaine pendant la pandémie de 1918-1919, supposant une étiologie commune (Nelson and Worobey, 2018). La circulation du virus influenza chez les porcs aux Etats-Unis a été confirmée en 1931 lorsque le premier virus grippal a été isolé par Richard Shope (Shope, 1931).

3.2 Les virus influenza porcins de type A (swIAV)

3.2.1 Taxonomie et classification

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* qui comprend sept genres de virus : *Alpha-* ; *Beta-* ; *Delta-* et *Gamma-influenzavirus* ; *Isavirus* ; *Quaranzavirus* ; *Thogotovirus* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>). Certaines souches peuvent avoir une réplication efficace ainsi qu'une transmission soutenue chez certaines espèces de mammifères ; notamment les Hommes et les porcs. Les virus responsables de la grippe chez le porc sont essentiellement des virus de l'influenza de type A (IAV), par conséquent, nous nous focaliserons uniquement sur les IAV dans ce manuscrit. On parle des virus influenza porcins ou *swine influenza A virus* (swIAV) lorsque le virus est isolé à partir de prélèvement biologique de suidé (sanglier ou porc) (Simon, 2010).

La classification des IAV en sous-types est basée sur des propriétés antigéniques des protéines de surface de la particule virale : l'hémagglutinine (HA ou H) et la neuraminidase (NA ou N), qui vont permettre l'entrée et la libération du virus, respectivement (Dou et al., 2018). Actuellement, 18 HA (H1-18) (en prenant en compte les 2 HA des virus influenza de chauve-souris) et 11 NA (NA1-11) ont été identifiées (McKellar et al., 2021). Les réservoirs naturels de ces virus sont les oiseaux aquatiques sauvages (Dou et al., 2018). Trois sous-types dominants de swIAV circulent : H1N1, H3N2 et H1N2 et plusieurs lignages génétiques sont distingués au sein de chaque sous-type (Crisci et al., 2013) (Chastagner et al., 2020).

Actuellement, quatre lignages de swIAV sont enzootiques en Europe, i) le lignage « *avian-like swine H1N1* (H1_{av}N1) » ; ii) le lignage « *human-like reassortant swine H3N2* (H3N2) » ; iii) le lignage « *human-like reassortant swine H1N2* (H1_{hu}N2) » ; iv) le lignage « *pandemic-like swine H1N1* (H1N1pdm) ».

Les souches d'IAV sont nommées en fonction de la nomenclature suivante : A / l'hôte d'origine (sauf pour l'Homme) / l'origine géographique du prélèvement / le numéro d'identification propre au laboratoire ayant isolé la souche virale / l'année de prélèvement, par exemple, A/swine/France/22-130212/2013 (WHO, 1980).

3.2.2 Structure et composants des IAV

3.2.2.1 Organisation génomique des IAV

Les virus grippaux sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité négative. Le génome viral se compose de huit segments d'ARN empaqueté, grâce à des oligomères de nucléoprotéines (NP), en complexe ribonucléoprotéique hélicoïdal (vRNP) (figure 16) (Dou et al., 2018). Ce génome viral de 14 kb, code pour au moins 10 protéines, dont la protéine HA, la protéine NA, les protéines de matrice 1 (M1) et 2 (M2), la nucléoprotéine NP, la protéine non structurale (*non-structural protein*) NS1, la protéine d'export nucléaire (NS2 ou NEP) et trois sous-unités de la polymérase (*polymerase basic protein 1* (PB1), *polymerase basic protein 2* (PB2) et *polymerase acidic protein* (PA)) qui forment un complexe ARN-polymérase ARN-dépendant (Crisci et al., 2013; Mostafa et al., 2018; Nayak et al., 2009). PB1, PB2 et PA sont associées à chaque segment empaqueté et font partie des vRNP. D'autres protéines peuvent être obtenues par épissage alternatif, décalage du cadre de lecture ou initiation alternative de la traduction (PA-X, PB1-F2, PB1-N40, PA-N155, PA-N182, M42, NS3) (Hao et al., 2020).

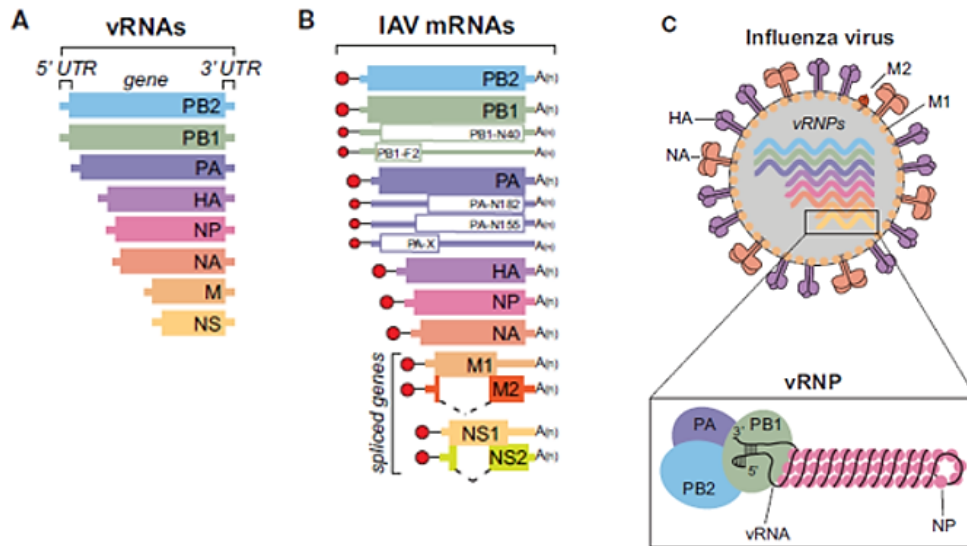


Figure 16 : Structure des IAV (Dou et al., 2018). **A)** Schéma des huit segments génomiques de l'ARN viral qui composent les génomes des IAV. **B)** Diagramme des ARNm viraux qui sont transcrits à partir des modèles d'ARN viraux des IAV. **C)** Schéma des IAV

3.2.2.2 Protéines de l'enveloppe et de la couche interne du virion

La protéine HA, est la protéine la plus abondante à la surface des virions et occupe approximativement 80% de l'enveloppe virale (Nayak et al., 2009). C'est une protéine trimérique qui forme une projection à la surface du virion (Cheung and Poon, 2007). Elle est la cible principale des anticorps neutralisants (Crisci et al., 2013), et est synthétisée sous la forme d'un précurseur HA0 non fonctionnel. Lors de l'infection virale, HA0 est clivé en deux sous-unités HA1 et HA2 par des protéases extracellulaires et transmembranaires présentes chez l'hôte (Le Boudier et al., 2010) rendant le virus infectieux. La sous-unité HA1 contient le site de liaison aux récepteurs cellulaires et est responsable de la fixation du virus via sa liaison aux résidus d'acides sialiques terminaux des glycoprotéines de la membrane cellulaire (Steinhauer, 1999). La sous-unité HA2 forme la majeure partie de la structure « tige » hautement conservée, qui ancre le domaine globulaire à la membrane virale et contient le peptide de fusion (Fan et al., 2015). La protéine NA est la seconde protéine la plus abondante à la surface des virions, occupant approximativement 17% de l'enveloppe virale (Nayak et al., 2009). Elle a une activité enzymatique importante qui va cliver l'acide sialique des récepteurs membranaires pour éviter la liaison des nouveaux virions à la cellule hôte. La NA participe à l'étape de bourgeonnement viral permettant ainsi la libération et la propagation de nouveaux virions (Crisci et al., 2013).

La couche interne de l'enveloppe virale est doublée et soutenue par la protéine M1 servant de lien entre l'enveloppe virale et le vRNP, tandis que la protéine M2 pénètre dans l'enveloppe virale et fonctionne comme un canal ionique en acidifiant la partie interne de la particule virale lors d'une infection (Nayak et al., 2004). Ces deux protéines matricielles sont activement impliquées dans le cycle de réplication virale (Nayak et al., 2004). Le complexe ARN-polymérase ARN-dépendant est composé de trois sous-unités : PB1, PB2 et PA. L'activité polymérase est répartie au sein de ces trois sous-unités. PB1, PB2 et PA sont essentielles au processus de transcription et de réplication virale (Bouvier and Palese, 2008; Vasin et al., 2014) (figure 16). La protéine NS2, aussi connue sous le nom de NEP, est hautement conservée et comprend un domaine N-terminal avec deux signaux d'exportation nucléaire (NES) et un domaine C-terminal (Hao et al., 2020). NS2 était initialement considérée comme une protéine non structurale, cependant, des études ont trouvé une petite quantité de NS2 à l'intérieur de la particule virale (Hutchinson et al., 2014). NS2 est impliquée dans l'export nucléaire (Hao et al., 2020) et a aussi un rôle dans la régulation de la balance entre la transcription et la réplication (Mänz et al., 2012).

La protéine NP est un composant majeur des complexes vRNP, et les fonctions reconnues de la NP comprennent, entre autres, le transport, la transcription et la réplication du génome viral (Hu et al., 2017). La NP interagit aussi directement avec les sous-unités PB1 et PB2 de la polymérase virale.

3.2.2.3 Protéines non structurales

La protéine NS1 est un régulateur immunitaire crucial qui a une action antagoniste sur la réponse antivirale à travers sa capacité à inhiber la production d'IFN-I. Cette protéine est également impliquée dans la pathogénicité du virus à travers sa capacité à induire l'apoptose, à exacerber la réponse inflammatoire et à contrôler l'épissage et la traduction des ARNm viraux (Han et al., 2019; Hao et al., 2020) (figure 17).

La protéine PB1-F2 n'est pas présente dans toutes les souches d'IAV. Cette protéine a la capacité de se localiser dans les mitochondries et induire la mort cellulaire (Zamarin et al., 2005) (figure 17). De récentes études ont découvert que la PB1-F2 pouvait bloquer la voie de signalisation RIG-I, moduler l'activation de l'inflammasome NLRP3, améliorer l'activité de la polymérase virale et favoriser la pathogénicité virale (Hao et al., 2020).

La protéine PA-X fournit une activité endonucléolytique qui lui donne la capacité de dégrader l'ARN (Jagger et al., 2012) (figure 17). Fait intéressant, la protéine PA-X dégrade

sélectivement l'ARN polymérase II et les ARNs non codants de l'hôte, alors qu'elle n'a aucun effet sur la production de Pol I et Pol III et de l'ARNm viral (Khapersky et al., 2016).

De nombreuses autres protéines non structurales ont été également découvertes tels que, PB1-N40 (segment 2) (Wise et al., 2009), PA-N155 (segment 3) (Muramoto et al., 2013), PA-N182 (segment 3) (Muramoto et al., 2013), M42 (segment 7) (Wise et al., 2012) et NS3 (Selman et al., 2012) (Vasin et al., 2014).

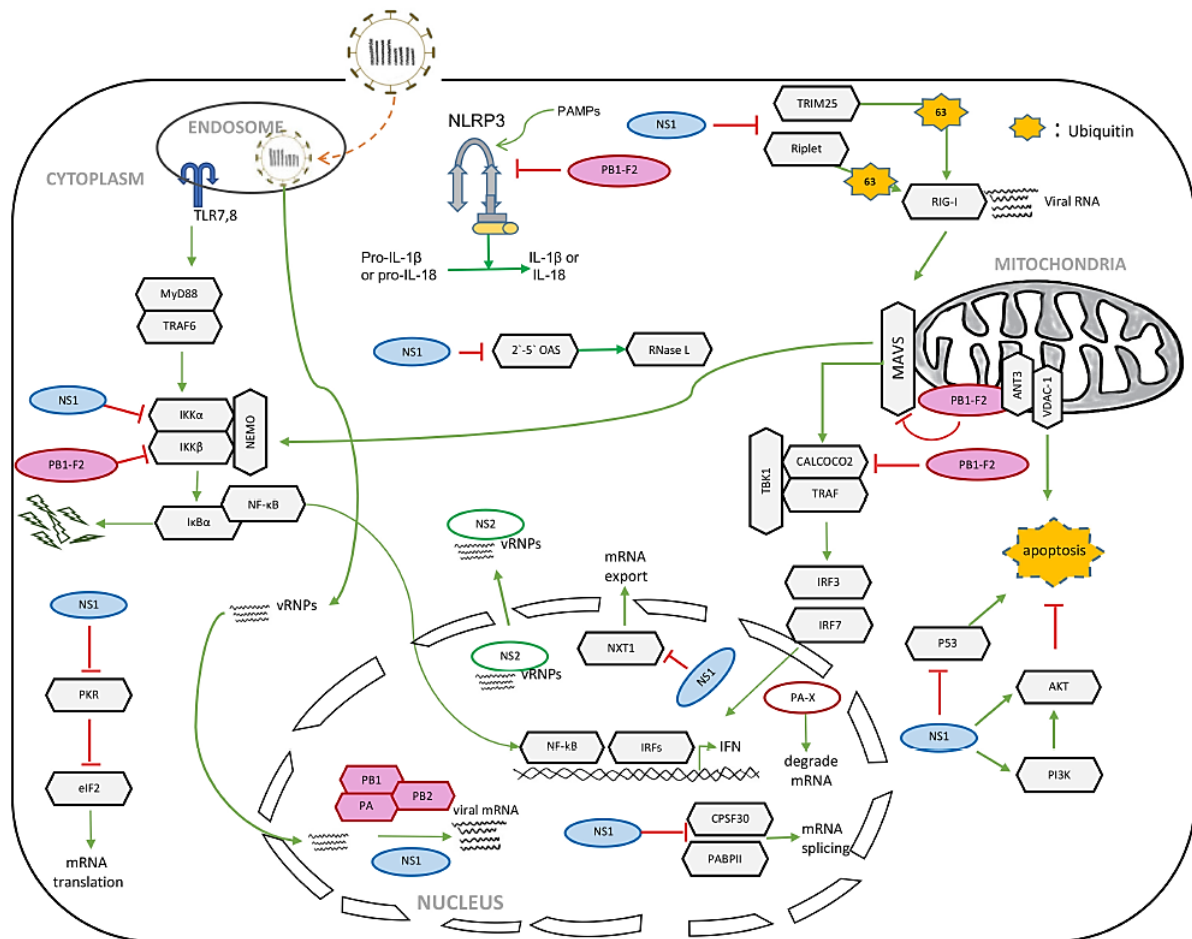


Figure 17: Rôle des protéines non structurales dans la réplication des IAV et dans la défense innée de l'hôte (Hao et al., 2020). NS1 est capable d'inhiber la production d'IFN-I, d'induire de l'apoptose et d'exacerber la réponse inflammatoire. PB1-F2 est capable d'induire la mort cellulaire. PA-X dégrade l'ARN de l'hôte

3.2.3 Cycle viral

3.2.3.1 Cellules cibles

Les IAV vont infecter principalement les cellules épithéliales du tractus respiratoire, bien que les cellules immunitaires telles que les macrophages des voies respiratoires et les cellules dendritiques soient également sensibles à cette infection (Crisci et al., 2013). Alors que

l'infection des cellules épithéliales du tractus respiratoire par les IAV entraîne une multiplication virale, ce processus est généralement limité lors de l'infection des macrophages alvéolaires ou des cellules dendritiques (Villalón-Letelier et al., 2017). Les étapes clés de la réplication des IAV lors d'une infection des cellules épithéliales ont été bien étudiées alors que l'étude de l'infection des macrophages alvéolaires est incomplète (Meischel et al., 2020).

3.2.3.2 Le cycle de réplication

3.2.3.2.1 Cellules épithéliales

Les IAV initient le processus d'infection via la protéine HA située sur l'enveloppe virale (figure 18). En atteignant une cellule épithéliale cible, la sous-unité HA1 de la protéine HA se fixe à l'acide sialique lié en α -2.3 (ou α -2.3-SA) ou α -2.6 (ou α -2.6-SA) au galactose sous-jacent des glycoprotéines de la membrane cellulaire. Les IAV humains et porcins, ayant un tropisme respiratoire, se lient généralement aux α -2.6-SA des cellules épithéliales du tractus respiratoire. A l'inverse, les IAV aviaires, ayant un tropisme digestif, se lient généralement aux α -2.3-SA des cellules épithéliales du tractus digestif (Dou et al., 2018). Après la fixation à la surface cellulaire, le virus pénètre dans la cellule hôte par endocytose et se retrouve dans un endosome précoce. L'acidification intra-endosomique est médiée par des ATPases cellulaires, et va conduire à la mise en place de deux événements : i) une modification conformationnelle de la protéine HA2 aboutissant ainsi à l'exposition du peptide de fusion, ce qui va initier la fusion entre la bicouche lipidique virale et la membrane endosomale, et ii) l'activation du canal ionique M2 responsable de l'acidification de la particule virale, dissociant ainsi les vRNP de la couche de protéines M1 qui tapissent la couche interne de la particule virale. Ces deux événements pH dépendants vont permettre la libération des complexes vRNP dans le cytoplasme de la cellule hôte infectée (Dou et al., 2018). Les complexes vRNP vont ensuite être transloqués dans le noyau de la cellule hôte via des *nuclear localization signal* (NLS) présents au niveau de la protéine NP, composant des vRNP. Le vRNP est alors reconnu par l'importine- α , conduisant au recrutement d'importine- β , facilitant ainsi le transport à travers le complexe du pore nucléaire (NPC) vers le noyau cellulaire. A l'intérieur du noyau, le complexe ARN-polymérase ARN-dépendant présent sur chaque vRNP va synthétiser, à partir de l'ARN viral négatif, deux types d'ARN positifs : l'ARN complémentaire (ARNc) et l'ARN messager (ARNm). L'ARNc participera à la synthèse de copies d'ARN viral et l'ARNm sera par la suite exporté dans le cytoplasme pour la synthèse des protéines virales.

Les protéines de l'enveloppe (HA, NA et M2) sont traduites à partir des ARNm par les ribosomes du réticulum endoplasmique pour ensuite migrer vers la membrane plasmique cellulaire via l'appareil de Golgi. Les autres protéines virales sont traduites dans le cytoplasme. Les protéines PB1, PB2, PA, NP sont importées dans le noyau cellulaire pour former de nouveaux vRNP (association avec un segment d'ARN de polarité négative) ou des cRNP (association avec un segment d'ARN de polarité positive) afin à la fois de permettre la réplication du génome viral et l'amplification de la transcription d'ARNm viraux mais également de former de nouveaux complexes vRNP qui seront encapsidés dans les nouvelles particules produites. Les protéines M1 et NS2 vont également migrer dans le noyau pour ainsi se lier aux complexes vRNP néo-synthétisés et permettre leur transport hors du noyau grâce aux motifs d'export nucléaire présent sur les protéines NS2 (Bouvier and Palese, 2008). Une fois dans le cytoplasme, l'interaction entre les protéines M1 et NP masque le motif NLS empêchant ainsi le retour dans le noyau (Bui et al., 1996). Les vRNP et les protéines virales vont migrer dans le cytoplasme pour atteindre la face interne de la membrane plasmique et s'y accumuler. Le bourgeonnement des particules virales, soit la dernière étape du cycle, implique les protéines virales H1, NA, M1 et M2. La protéine M1 va faire une asymétrie dans la bicouche lipidique pour ainsi créer un bourgeonnement. La NA va cliver l'acide sialique des récepteurs membranaires afin d'éviter l'agrégation des particules virales à la surface des cellules hôtes infectées et favoriser leurs disséminations dans les voies respiratoires (Bouvier and Palese, 2008).

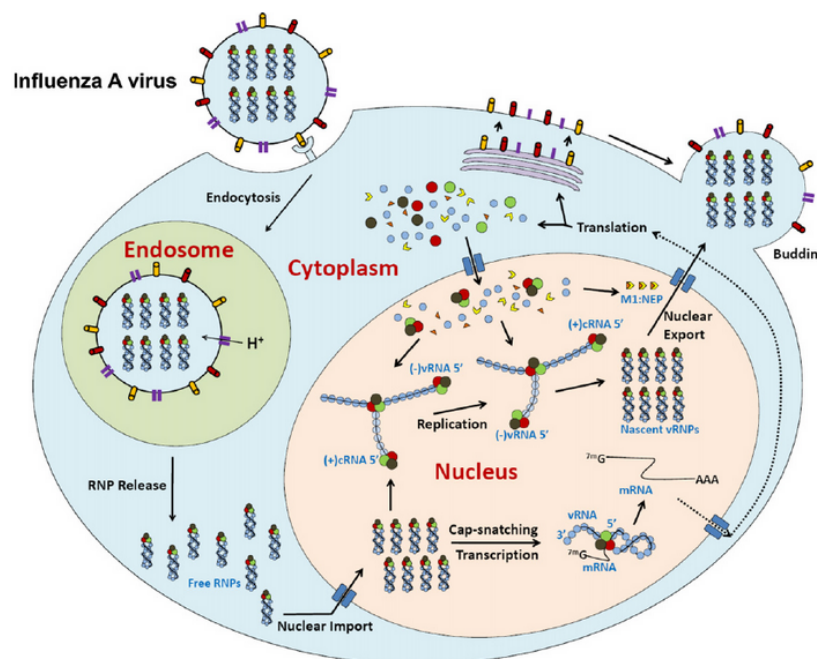


Figure 18 : Cycle de réplication des IAV dans des cellules épithéliales (Zheng and Tao, 2013). Après l'attachement du virus grippal à son récepteur cellulaire (acides sialiques) et endocytose, les vRNP sont

alors relargués dans le cytoplasme et transportées vers le noyau (site de réplication et de transcription). Les ARNm sont exportés vers le cytoplasme pour être ensuite traduits. Les protéines M1 et NS2 vont faciliter l'export nucléaire des vRNP néo-synthétisés. L'étape d'assemblage pour le bourgeonnement des nouveaux virions se déroule au niveau de la membrane plasmique.

3.2.3.2.2 Macrophages

Les macrophages sont également permissifs à l'infection par les IAV (Londrigan et al., 2015) (figure 19).

La première étape d'attachement se fait par reconnaissance des récepteurs des acides sialiques liés en α -2.3-SA ou α -2.6-SA par la HA des IAV. L'étape d'entrée se fait par reconnaissance des *N-linked glycan* de la HA par les récepteurs CLR (*C-type lectin receptors*). Les voies d'entrées des IAV lors de l'infection des macrophages alvéolaires n'ont été que très peu définies. Les étapes de réplication des ARN viraux, de synthèse et de transport des protéines virales ne sont pas connues. Concernant les étapes d'assemblage et de bourgeonnement, une interaction inefficace entre la HA et la M2 à la surface des cellules peut conduire à une altération des étapes de bourgeonnement et de libération de nouveaux virions (Meischel et al., 2020).

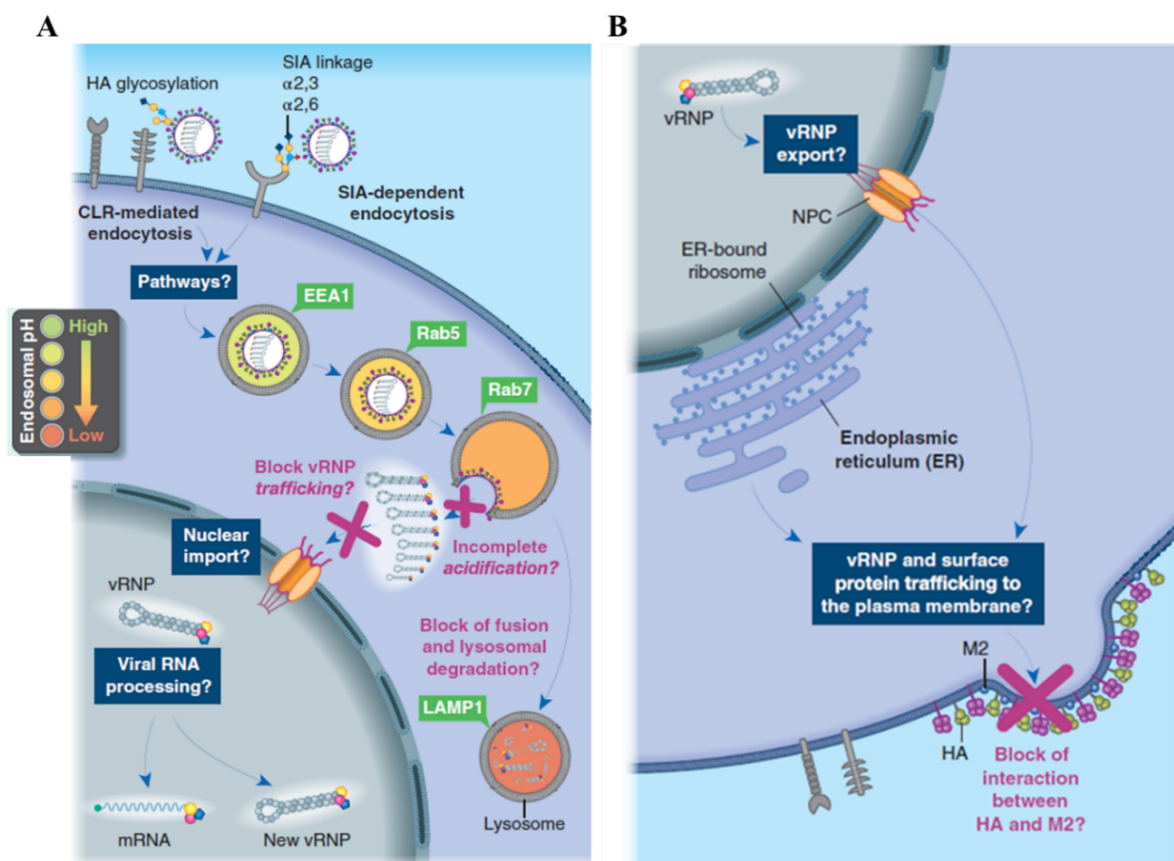


Figure 19 : Cycle de réplication des IAV dans des macrophages (Meischel et al., 2020). (A) (1) : Etape d'attachement. Reconnaissance des récepteurs des acides sialiques liés en α -2.3-SA ou α -2.6-SA par la protéine HA des IAV. (2) : Entrée. Reconnaissance des N-linked glycan de la protéine HA par les récepteurs CLR (les connaissances concernant les voies d'entrées des IAV lors de l'infection des macrophages alvéolaires ne sont que partielles). (3) Réplication des ARN viraux. Actuellement non défini. (4) Traduction protéique. La réplication des ARN viraux peut être bloquée après l'internalisation et avant l'importation nucléaire des vRNP (soit en empêchant la fusion endosomale, soit en restreignant la migration des vRNP vers le noyau). (B) (5) Synthèse et transport des protéines virales. Actuellement non défini. (6) Assemblage et bourgeonnement. La localisation des protéines HA, NA et M2 a été observée au niveau de la membrane plasmique. Une étape de blocage de l'interaction entre les protéines HA et M2 est possible, empêchant ainsi l'étape de bourgeonnement et de libération de nouveaux virions. CLR : C-type lectin receptors ; HA : hémagglutinine ; mRNA : ARN messenger ; SIA : acide sialique ; vRNP : complexe ribonucléoprotéique viral.

3.2.4 Variabilité des virus influenza A

Les IAV sont très instables génétiquement. Il existe trois mécanismes responsables de l'apparition de nouvelles souches antigéniquement différentes: 1) le glissement antigénique (ou *antigenic drift*) ; 2) la cassure antigénique (ou *antigenic shift*) et 3) le transfert d'un virus *in toto* d'une espèce animale à une autre (Krammer et al., 2018b). Ces phénomènes peuvent avoir des conséquences en terme de tropisme tissulaire, de virulence, de potentiel de transmission et de validité des outils de diagnostic.

Le glissement antigénique est le processus par lequel des changements mineurs sont introduits dans les épitopes viraux clés par des mutations ponctuelles dans le génome viral (Kim et al., 2018). De fréquentes mutations sont introduites dans le génome des IAV au cours du cycle de réplication en raison des nombreuses erreurs commises lors de la copie par l'ARN polymérase ARN-dépendante. Certaines mutations peuvent se produire dans les régions antigéniques des glycoprotéines HA et/ou NA. L'accumulation progressive de mutations dans la HA et/ou la NA peut conduire à l'échappement du virus vis-à-vis de la réponse immunitaire à médiation humorale.

Contrairement au glissement antigénique, la cassure antigénique résulte de modifications génomiques importantes. Lorsqu'un hôte est infecté de manière simultanée par deux sous-types viraux, les segments d'ARN des deux virus vont pouvoir se répliquer dans la même cellule hôte. Lors de l'assemblage des nouveaux virions, les segments d'ARN des deux souches peuvent être mélangés (réassortiment génétique), aboutissant ainsi à une nouvelle souche virale, si la nouvelle constellation de segments est viable (Kim et al., 2018; Krammer et al., 2018b).

Et enfin, le transfert *in toto* d'un virus d'une autre espèce animale peut aussi être responsable de l'apparition de nouvelles souches antigéniquement différentes (Simon., 2010). En effet, le

spectre d'hôte des IAV est généralement restreint à une espèce donnée, mais des événements de franchissement des barrières d'espèces peuvent être observés (figure 20). Les swIAV peuvent être transmis à certaines volailles (comme la dinde), à l'Homme (zoonose) (Choi et al., 2004), ou à d'autres mammifères tel que le vison (Gagnon et al., 2009). En 2009, un virus multi-réassortant d'origine porcine possédant un fort potentiel de transmission interhumaine a émergé chez l'Homme et a été responsable d'une pandémie. Ce virus (H1N1pdm09) continue de circuler chez l'Homme et est responsable d'épidémies de grippe saisonnières. A l'inverse, des virus humains ont également pu être isolés chez le porc. Leur propagation *in toto* dans l'espèce porcine, à l'instar du virus H1N1pdm09 qui a été transmis en retour aux porcins (zoonose inverse), reste un événement assez rare, mais des segments de virus humains sont régulièrement introduits dans des virus porcins. Les porcs peuvent également être infectés naturellement par des virus influenza aviaires mais ceux-ci semblent se répliquer moins efficacement que les virus influenza porcins (De Vleeschauwer et al., 2009 ; Van Poucke et al., 2010). Le porc est l'espèce mammifère domestiquée, élevée en grand nombre, qui est sensible à la fois à l'infection par les virus aviaires et humains (Simon et al., 2010). Des études ont montré quela distribution des récepteurs cellulaires aux virus influenza est similaire chez l'Homme et le porc, soit une prédominance de récepteurs AS α 2,6Gal au niveau de l'épithélium du tractus respiratoire supérieur et une augmentation de la présence de récepteurs AS α 2,3Gal accessibles au niveau de l'épithélium des voies respiratoires inférieures (Nelli et al., 2010, Trebbien et al., 2011 ; Van Poucke et al., 2010). Ainsi, il semblerait que le porc ne soit pas plus à même que l'Homme de servir d'hôte pour l'adaptation des virus aviaires à l'espèce mammifère ou pour la génération de virus réassortants entre virus d'origines diverses (Van Reeth, 2007). La nature des virus grippaux qui circulent dans l'espèce porcine indique cependant que des réassortiments se produisent chez cet animal à une fréquence importante. Ceci montre l'importance du porc en tant qu'hôte intermédiaire pour la génération de virus réassortants à potentiel zoonotique (Kocer et al., 2013).

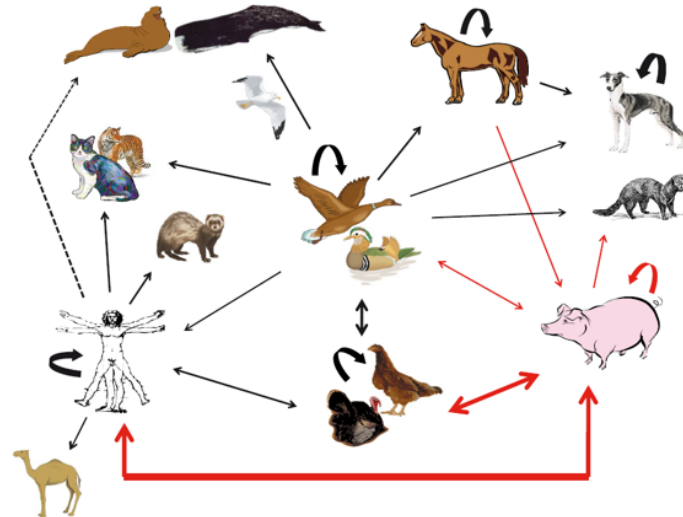


Figure 20 : La place du porc dans un schéma de la transmission inter-espèces des IAV (Simon, 2010). Les flèches indiquent les transmissions documentées d’IAV d’une espèce donneuse vers une espèce receveuse. Les flèches rouges représentent la transmission des IAV vers et depuis l’espèce porcine. L’épaisseur des flèches donne l’indication relative quant aux fréquences apparentes de transmissions. Les flèches en pointillés indiquent l’hypothèse de la transmission inter-espèce qui repose uniquement sur des investigations sérologiques et non virologiques.

3.3 Clinique et physiopathologie des infections swIAV

3.3.1 Signes cliniques

La pathogénicité des swIAV est bien caractérisée et est très similaire à celle des IAV chez l’Homme, bien que moins marquée. La période d’incubation peut varier de 1 à 3 jours (Kothalawala et al., 2006). Le taux de mortalité reste généralement très faible (moins de 1%), contrairement au taux de morbidité qui peut aller jusqu’à 100% en fonction de la virulence de la souche impliquée (Van Reeth et al., 2012). La grippe porcine est une maladie aiguë caractérisée par de l’hyperthermie (40,5-41,5°C), de la léthargie, de l’apathie, une anorexie, de la polypnée et une discordance respiratoire. Des symptômes respiratoires tels que la toux, des éternuements et de la dyspnée peuvent aussi apparaître (Van Reeth et al., 2012). L’infection par les swIAV peut également provoquer des avortements lorsque celle-ci touche les truies gestantes (Deblanc and Simon, 2017). La sévérité de la grippe peut varier en fonction de la virulence du sous-type impliqué mais également du stade physiologique des animaux ainsi que du statut immunitaire des troupeaux, des pratiques sanitaires et des infections virales ou bactériennes concomitantes (Simon et al., 2013). Les formes de grippe sévères sont généralement issues des cas de co-infections, lesquelles peuvent entraîner des complications. Certaines infections conduisent à un syndrome grippal difficilement identifiable, probablement en raison du virus impliqué, de la physiologie de l’animal ou de

l'environnement. La grippe d'intensité « normale », conduit à des manifestations cliniques modérées, telles que l'hyperthermie, des signes respiratoires frustrés ou modérés (toux, éternuements, dyspnée) et éventuellement une apathie associée à de l'anorexie pendant une période de 2-3 jours. La grippe d'intensité « élevée », conduit quant à elle, à des manifestations cliniques marquées, telles que l'hyperthermie et des signes respiratoires sévères (toux quinteuse, dyspnée) sur une large proportion d'animaux. Cette grippe d'intensité « élevée » peut persister plusieurs jours et éventuellement induire une mortalité.

3.3.2 Lésions pulmonaires

Les lésions pulmonaires macroscopiques observées chez le porc sont généralement des lésions de pneumonie (Van Reeth et al., 2012). Dans les infections bénignes, des petits groupes de lobules de couleur rouge foncé sont situés dans les lobes pulmonaires crâniens et moyens et parfois dans les parties cranioventrales des lobes caudaux et dans les lobes accessoires (figure 21). Chez certains porcs, ces foyers de consolidation sont quelque peu linéaires et confluent, et se situent dans la région hilare à la jonction des lobes pulmonaires. Dans les infections plus sévères ou étendues, la plupart ou la totalité des lobes pulmonaires crâniens et moyens ainsi que les parties cranioventrales des lobes caudaux peuvent être consolidées. Moins fréquemment, une infection aiguë sévère se présente sous la forme d'un poumon congestionné de façon diffuse, avec un œdème interlobulaire important (Janke, 2014). L'étendue des lésions est variable en fonction de la sévérité de l'infection et peut représenter plus de 50% du poumon 4-5 jours après l'infection à swIAV (Van Reeth et al., 2012).

Les lésions pulmonaires microscopiques correspondent à une bronchiolite ainsi qu'à une pneumonie interstitielle et se caractérisent par la nécrose de l'épithélium pulmonaire, la desquamation de la couche de cellules épithéliales bronchiques et/ou bronchiolaires et l'obstruction des voies respiratoires par des cellules épithéliales nécrosées et des cellules inflammatoires, principalement des neutrophiles (Van Reeth et al., 2012) (figure 21).

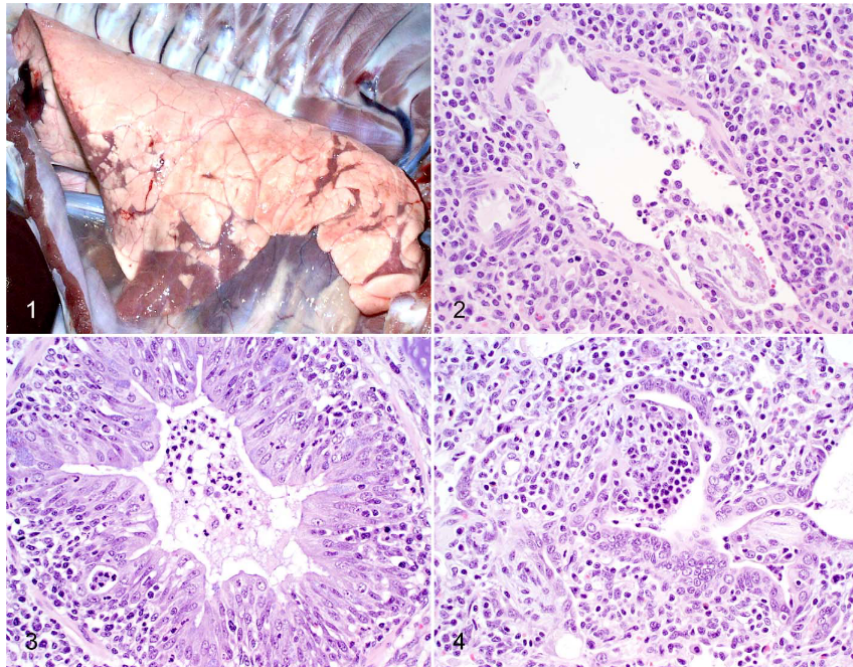


Figure 21 : Lésions pulmonaires de porcs infectés par un swIAV (**Haut, gauche**) Poumon *in situ*, porc âgé de 4 semaines, 5 jours post inoculation intratrachéale d'un swIAV. Consolidation lobulaire multifocale dans les lobes pulmonaires crâniens et moyens. (**Haut, droite**) Poumon, porc, cas de terrain. Nécrose et desquamation des cellules épithéliales bronchiolaires et aplatissement des cellules restantes qui tapissent les voies respiratoires (phase aiguë de l'infection). (**Bas gauche**) Poumon, porc, cas de terrain. Une couche épithéliale hyperplasique irrégulière qui tapisse les voies respiratoires (phase subaiguë de l'infection). (**Bas droite**) Poumon de porc, cas de terrain. Bronchiolite oblitérante (Janke, 2014).

3.3.3 Facteurs de virulence

3.3.3.1 Facteurs liés au virus

La virulence des IAV est déterminée à travers la capacité du virus à infecter les tissus, la gravité de la maladie ainsi que sa capacité de propagation au sein d'une population sensible. Certains examens pathologiques ciblant des poumons de porcs et d'Homme infectés naturellement par des IAV suggèrent que les virus qui induisent une inflammation des voies respiratoires inférieures provoquent les cas de grippe les plus sévères (Janke, 2014). Une étude réalisée au sein de notre laboratoire ainsi que d'autres études ont mis en évidence que la sévérité des signes cliniques et des lésions pulmonaires pouvait différer en fonction des sous-types viraux (Deblanc et al., 2012; Landolt et al., 2003; Lyoo et al., 2014; Meng et al., 2013). La protéine HA est considérée comme étant un déterminant majeur de la virulence et de la spécificité d'hôte. En effet, des études ont montré que des mutations de la protéine HA pouvaient affecter l'antigénicité, ainsi que la pathogénicité et la transmission du swIAV (Henningson et al., 2015; Lorusso et al., 2014). Les protéines NA et PA semblent augmenter

la pathogénicité de ces virus lors de l'inoculation chez la souris et le furet (Dlugolenski et al., 2015). La protéine PB1-F2, lorsque présente, est capable d'augmenter la réponse inflammatoire et retarder l'élimination du virus au niveau pulmonaire, mais aussi, d'augmenter la fréquence et la sévérité des pneumonies bactériennes secondaires (Chakrabarti and Pasricha, 2013; Munier et al., 2010). La protéine NS1, absente du virion, est exprimée dans les cellules infectées, où elle exerce plusieurs fonctions telle que l'inhibition de la réponse interféron de la cellule infectée. Des polymorphismes dans la séquence en acides aminés de cette protéine peuvent se traduire par des variations du pouvoir pathogène (Munier et al., 2010).

3.3.3.2 Facteurs liés à l'hôte

Les infections à swIAV touchent les animaux à tous les âges (Hervé et al., 2019). Par contre, l'âge semble avoir un impact sur l'intensité des signes cliniques. En effet, une étude a mis en évidence que des porcs à 7 semaines d'âge présentaient un retard de croissance moins important et des signes cliniques moins graves que les porcs à 15 semaines d'âge (Loeffen et al., 2003). La faible présence de signes cliniques chez les porcelets en élevage serait potentiellement liée à la présence d'AOM. Suite à un épisode infectieux ou une vaccination, les truies peuvent présenter des anticorps vis-à-vis du swIAV et ainsi les transmettre à leur progéniture. Les porcelets sont ainsi porteurs d'une immunité passive pendant 8 à 13 semaines (Markowska-Daniel et al., 2011; Rose et al., 2013; Vincent et al., 2012), ce qui les protège cliniquement, comme cela a été observé au laboratoire (Deblanc et al., 2018). Une étude réalisée au sein de notre laboratoire a montré au cours d'un suivi longitudinal réalisé dans des élevages infectés chroniquement, une altération de la réponse immunitaire humorale chez les porcelets présentant une immunité passive et infectés précocement (Rose et al., 2013). Ceci pourrait favoriser une seconde infection par un virus grippal (Loeffen et al., 2003; Rose et al., 2013). L'intensité de la réponse immunitaire post-infectieuse peut également jouer un rôle dans la sévérité de l'infection grippale. Les infections les plus virulentes par les swIAV présentent certaines caractéristiques d'infections : 1) des niveaux plus élevés ou plus prolongés de répllication virale, 2) l'induction d'une forte réponse pro-inflammatoire, pouvant conduire à une tempête cytokinique et 3) une atteinte du tractus respiratoire à travers une augmentation de la perméabilité du système vasculaire alvéolaire (Janke, 2014). La qualité, ainsi que l'intensité de la réponse immunitaire peuvent être influencées par des facteurs environnementaux, qui seront évoqués dans la partie 3.3.3.3, mais aussi des facteurs

génétiques de l'hôte. Chez le porc, une étude a investigué l'impact des facteurs génétiques de l'animal sur l'infection grippale (Nakajima et al., 2007). Ils ont analysé l'influence de quatre allèles du gène Mx1 identifiés chez le porc en infectant des cellules qui exprimaient ces différentes formes de Mx1 et ils ont montré que la réplication virale pouvait être 10 à 100 fois plus forte en fonction de l'origine du gène Mx1.

3.3.3.3 Facteurs liés à l'environnement

Les facteurs environnementaux peuvent également influencer la sévérité des symptômes chez l'hôte ainsi que la persistance des virus dans l'élevage (Stärk, 2000). Le statut sanitaire de l'élevage, l'hébergement, les conditions climatiques ou les pratiques d'élevages peuvent donc jouer un rôle dans la virulence. Les facteurs non infectieux contribuent de manière significative aux maladies respiratoires, soit en favorisant la transmission et la propagation des agents pathogènes, soit en créant des conditions défavorables qui peuvent entraîner un stress accru pour l'animal ou des lésions des voies respiratoires. Au cours des trente dernières années, la production porcine s'est intensifiée, conduisant à des troupeaux plus grands, pouvant aboutir à l'augmentation des maladies respiratoires. Il n'est pas rare d'avoir des élevages composés de milliers de porcs dans des bâtiments fermés ou semi-fermés, soulignant ainsi l'importance d'une ventilation et d'une élimination des déchets appropriées pour la santé des animaux. La surpopulation et/ou une ventilation inadéquate peuvent entraîner un stress chez l'animal et une augmentation des niveaux d'ammoniac et de poussières qui ont un impact négatif sur les défenses des voies respiratoires du porc (Brockmeier, 2002). Cette surpopulation dans les élevages peut également conduire à un stress social, en particulier pour les animaux dominés, altérant les réponses immunitaires et affectant ainsi leurs capacités de résistance vis-à-vis d'infections (Merlot, 2004; Morrow-Tesch et al., 1994). Les facteurs d'élevage pouvant être associés à l'infection des porcs en engraissement par les swIAV H1_{av}N2 et H1_{hu}N2 ont été étudiés dans le cadre d'une étude transversale réalisée au laboratoire. Dans cette étude menée dans le Grand-Ouest de la France, il a été noté que le nombre d'élevages porcins autour du site pouvait augmenter la probabilité d'infection grippale, et qu'un nombre élevé de porcs par case ainsi qu'une faible surface par porc en post-sevrage constituaient des pratiques associées aux élevages infectés par les H1_{av}N1 et H1_{hu}N2, respectivement (Fablet et al., 2012a).

La sévérité de la grippe peut également dépendre de la présence d'autres pathogènes respiratoires au sein de l'élevage (Saade et al., 2020a). Les connaissances sur les interactions

entre swIAV et autres pathogènes respiratoires dans un contexte de co/super-infection sont rapportées plus loin (voir partie 4 de cette synthèse bibliographique).

3.4 Epidémiologie

Après la pandémie humaine de 1918, le virus H1N1 classique (cH1N1) a été détecté et est devenu enzootique chez les porcs du monde entier. Le virus porcin cH1N1 s'est maintenu et a circulé dans la population porcine pendant plusieurs décennies avant de disparaître en Europe et en Asie vers la fin des années 70, puis en Amérique du Nord bien plus tard, pour être remplacé par de nouveaux virus de grippe porcine (Ma, 2020).

3.4.1 Situation des swIAV en Europe et en France

En Europe, les premières propagations importantes d'IAV sont survenues en 1979 suite à la transmission d'un virus aviaire H1N1 de canards sauvages aux porcs en Allemagne et en Belgique (Pensaert et al., 1981). Ce virus a alors été nommé « *European avian-like swine H1N1* (H1_{av}N1) » (figure 22). Les virus H1_{av}N1 se sont propagés rapidement et sont devenus prédominants à travers l'Europe (Hervé et al., 2019; Simon et al., 2014). Au milieu des années 1980, le virus *European reassortant human-like swine* H3N2 est apparu et s'est propagé, devenant alors le deuxième sous-type de virus enzootique en Europe. Ce virus résulte d'un réassortiment entre la HA et la NA du virus *human-like swine* H3N2 et six gènes internes du virus H1_{av}N1 (Simon et al., 2014). Dans le milieu des années 1990, un réassortiment entre les virus *European reassortant human-like swine* H3N2 et *human-seasonal* H1N1 a généré le lignage *human-like reassortant swine* H1_{hu}N2 (Brown et al., 1998; Van Reeth et al., 2000). Pendant de nombreuses années, ces trois lignées ont co-circulé en Europe (Simon et al., 2014; Watson et al., 2015) jusqu'à l'émergence en 2009 du virus H1N1pdm09 (Watson et al., 2015). Après la pandémie de 2009, le virus H1N1pdm09 s'est transmis aux porcs (première fois détecté en Irlande) et est devenu enzootique. Le H1N1pdm09 s'est par la suite réassortit largement avec les sous-types H1N1, H3N2 et H1N2 pré-existants (Mancera Gracia et al., 2020). Au Danemark, les virus H1N1pdm et H1_{av}N2 ont été plus fréquemment détectés que les virus H1_{av}N1 (Watson et al., 2015). En Allemagne et en Italie, la fréquence des virus réassortants hébergeant au moins un segment H1N1pdm a augmenté de façon continue depuis 2009 (Chiapponi et al., 2018; Pippig et al., 2016).

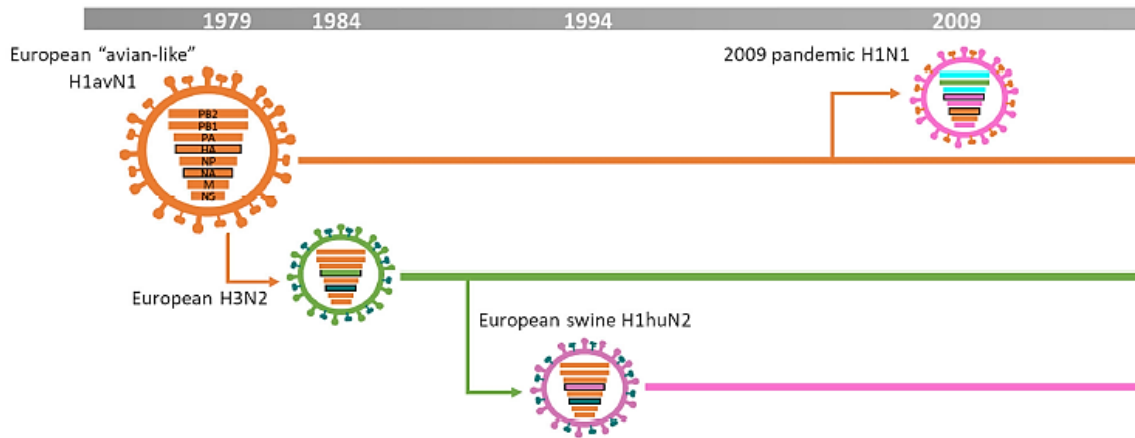


Figure 22 : Principaux sous-types de swIAV en Europe (Mancera Gracia et al., 2020)

En France, le virus H1N1pdm a été détecté dès 2010 chez le porc, mais sa diffusion sur le territoire semble avoir été beaucoup plus lente que dans d’autres pays (Chastagner et al., 2018). Suite à cette pandémie, un réseau national de surveillance des swIAV (Résavip) a été mis en place en 2011 en France métropolitaine (figure 23) (Garin et al., 2016). Cette surveillance permet de décrire la diversité génétique ainsi que la répartition géographique des swIAV. Les animateurs de région gèrent la base de donnée régionale et les kits de prélèvements qui sont en lien avec l’un des laboratoires d’analyses vétérinaires agréés par la direction générale de l’alimentation (DGAL) et le service régional de l’Alimentation. Le Laboratoire National de Référence (LNR) Influenza Porcin est hébergé par notre Unité et identifie les sous-types et lignages d’appartenance des virus détectés.

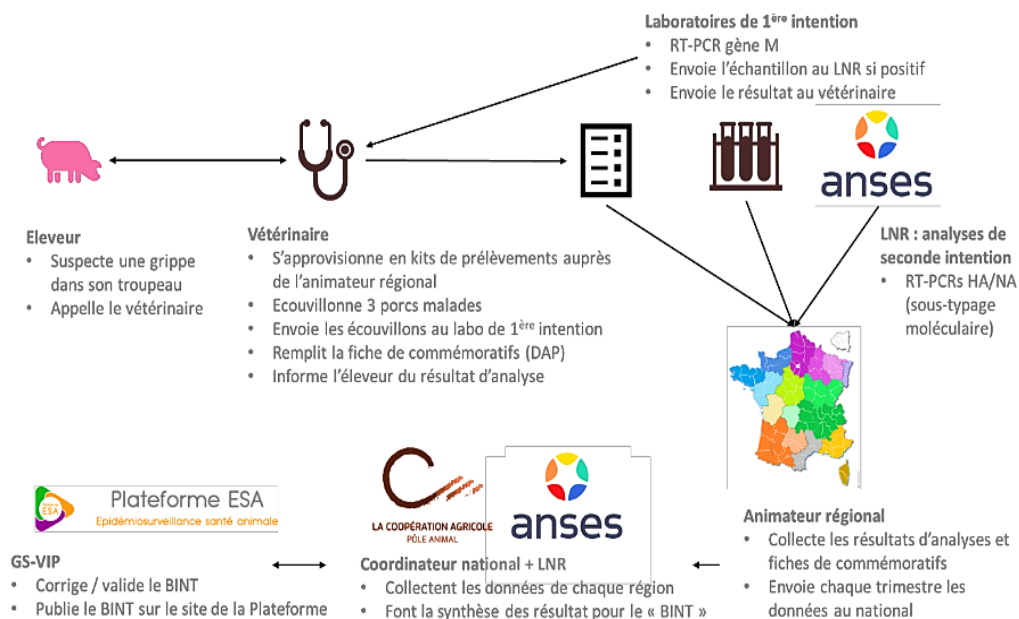


Figure 23 : Rôles des acteurs de Résavip. LNR : laboratoire national de référence (Dommergues et al., 2021)

Jusqu'en 2018, la surveillance des swIAV a montré une dominance des virus H1_{av}N1 et H1_{hu}N2, qui comptaient en moyenne pour environ 65% et 20-25% des virus identifiés chaque année (Chastagner et al., 2020), et rapporté des détections sporadiques de virus réassortants entre ces deux lignées enzootiques. Le H3N2 était rarement détecté (Hervé et al., 2019) (figure 24). Les virus H1_{av}N1 circulent sur tout le territoire, alors que les virus H1_{hu}N2 semblent quant à eux affecter les élevages de l'Ouest (Hervé et al., 2019).

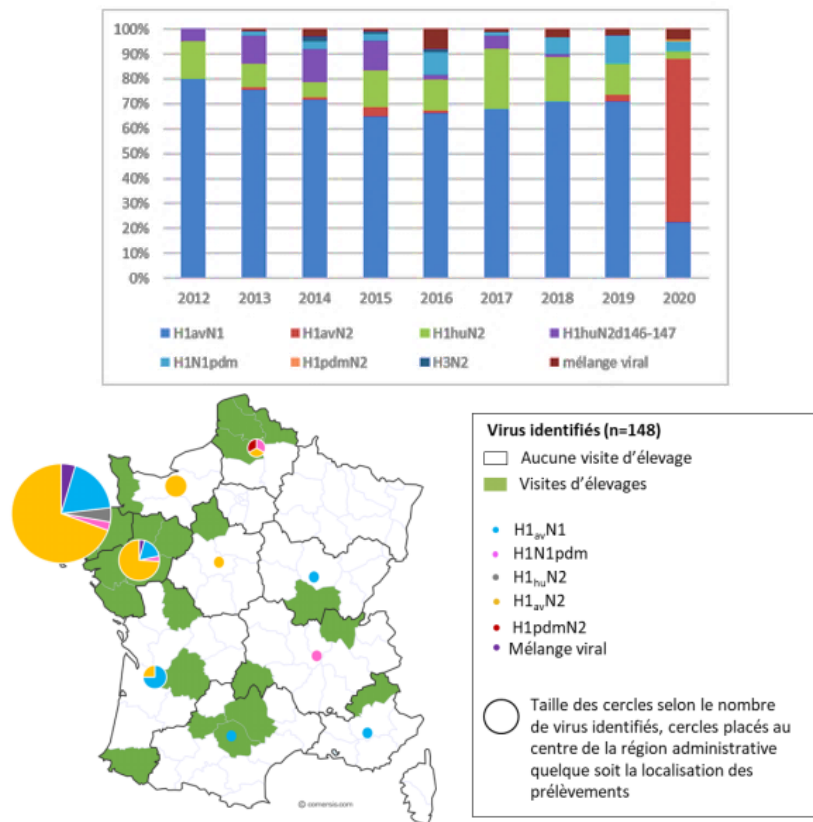


Figure 24 : (Haut) Proportions des différents lignages identifiés en France de 2012 à 2020 (Dommergues et al., 2021). (Bas) Proportions des différents lignages par région en 2020 (Dommergues et al., 2021).

En 2019, le nombre de cas de grippe dûs à des souches H1_{hu}N2 et H1N1pdm a diminué, alors que le nombre de cas dûs à des souches H1_{av}N2 (figure 25) a augmenté, conduisant ainsi à des modifications de proportions des sous-types viraux. En 2020, le premier cas d'infection par un virus H1_{av}N2 de génotype #E a été rapporté dans le Morbihan, puis il s'est propagé dans tout le Grand-Ouest (Hervé et al., 2021). Ce virus appartient au clade 1C.2.4 nouvellement défini et semble aussi diffuser dans la population porcine ailleurs en Europe (Danemark, Italie et Espagne notamment). Sa date exacte d'introduction en Bretagne n'a pas été déterminée.

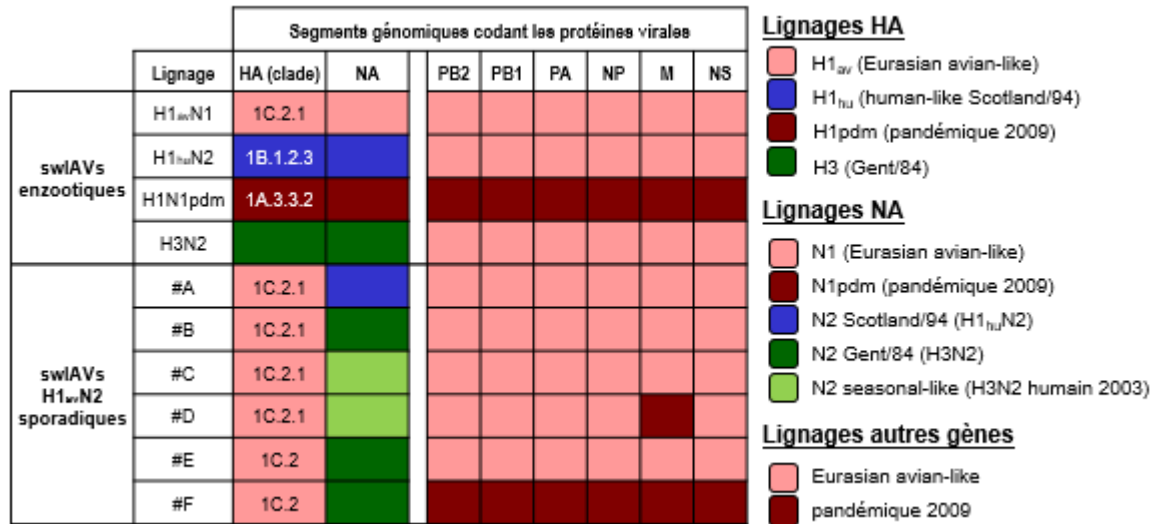


Figure 25 : Génotypes des swIAV enzootiques et des virus de lignage H1_{av}N2 identifiés en France en 2019-2020 (Hervé et al., 2020)

3.4.2 Formes épidémiologiques de la grippe chez le porc

Sous une forme de grippe épizootique, le virus se propage dans les différentes classes d'âge de porcs au moment d'épisodes infectieux, sans caractère de récurrence en fonction de l'âge de l'animal (Simon et al., 2013). Cette grippe dite classique est souvent décrite comme une affection épisodique touchant rapidement une grande proportion de l'élevage et le déstabilisant temporairement, et induisant peu de conséquences à long terme sur la santé du troupeau. L'âge médian de la grippe classique est de 13,5 semaines d'âge (Simon et al., 2013). Depuis les années 1980, un phénomène de persistance des virus grippaux dans les élevages porcins a été observé (Madec et al., 1985). Cette forme dite récurrente se répète à un stade physiologique donné, souvent en post-sevrage, sur toutes les bandes successives de l'élevage. La persistance virale dans les élevages porcins peut conférer au virus un caractère enzootique. Sous cette forme, le syndrome grippal semble moins collectif que la forme épizootique de la grippe classique. Cette forme récurrente peut entraîner une déstabilisation permanente de l'élevage et pourrait favoriser les sur-infections bactériennes ou virales ainsi que des réassortiments génomiques entre virus grippaux (Rose N, 2013; Simon et al., 2013). L'âge médian de la grippe récurrente est de 8 semaines d'âge (Simon et al., 2013). En France, environ 40% des infections grippales rapportées ont été observées dans un contexte de grippe récurrente (Dommergues et al., 2020).

3.4.3 Mode de transmission

Les swIAV se transmettent majoritairement par contact indirect via les aérosols et les gouttelettes formés lors d'épisodes de toux et d'éternuements, ou par contact direct à travers les sécrétions d'individus infectés ou via des objets contaminés. Le mode de transmission par contact indirect peut également jouer un rôle entre élevage. En effet, des prélèvements d'air réalisés dans plusieurs élevages porcins gravement infectés ont permis de détecter du génome viral jusqu'à 2 kilomètre de distance (Corzo et al., 2013; Tellier, 2009; Torremorell et al., 2012). Les swIAV ne se transmettent pas via la semence (Torremorell et al., 2012). Les porcs commencent à excréter le virus 24 hpi et sont contagieux pendant environ 7 jours (Janke, 2014). Au sein de notre laboratoire, il a été précédemment défini qu'une dose infectieuse de 10^6 TCID₅₀/porc, inoculée par voie trachéale, permettait de reproduire les signes cliniques de la grippe chez le porc EOPS (Deblanc et al., 2020).

3.4.4 Conséquences économiques pour la filière porcine

Les troubles respiratoires et le syndrome fébrile conduisent à une diminution immédiate des performances zootechniques. Des méta-analyses épidémiologiques ont déterminé que la séroprévalence mondiale des porcs et des troupeaux était de 49,9 et 72,8%, respectivement (Salvesen and Whitelaw, 2021). En France, entre 2011 et 2018, 48,6 % des élevages porcins avec des animaux présentant des signes cliniques étaient positifs aux swIAV (Hervé et al., 2019). Au Royaume-Uni, la perte financière résultant de la diminution du gain de poids des porcs avait été estimée à £7 par porc, soit une perte totale d'environ £60 millions/an (Kay et al., 1994). Aux Etats-Unis, la perte financière s'élève à environ \$3 par porc et lors des épisodes de co-infections impliquant les swIAV et un autre pathogène du CRP, cette perte s'alourdit à \$10 par porc (Haden et al., 2002).

3.5 Défenses de l'hôte vis-à-vis des swIAV

3.5.1 Immunité innée

Le système immunitaire inné représente la première ligne de défense contre les infections grippales. Il est constitué de nombreux composants, tels que le mucus, les collectines et les protéines de la phase aiguë, qui ont pour rôle de prévenir l'infection des cellules épithéliales respiratoires (figure 26) (Crisci et al., 2013). Les cellules de l'immunité innée comme les

macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules NK sont recrutées afin de contrôler la réplication et la dissémination du virus et aussi d'orchestrer la réponse immunitaire.

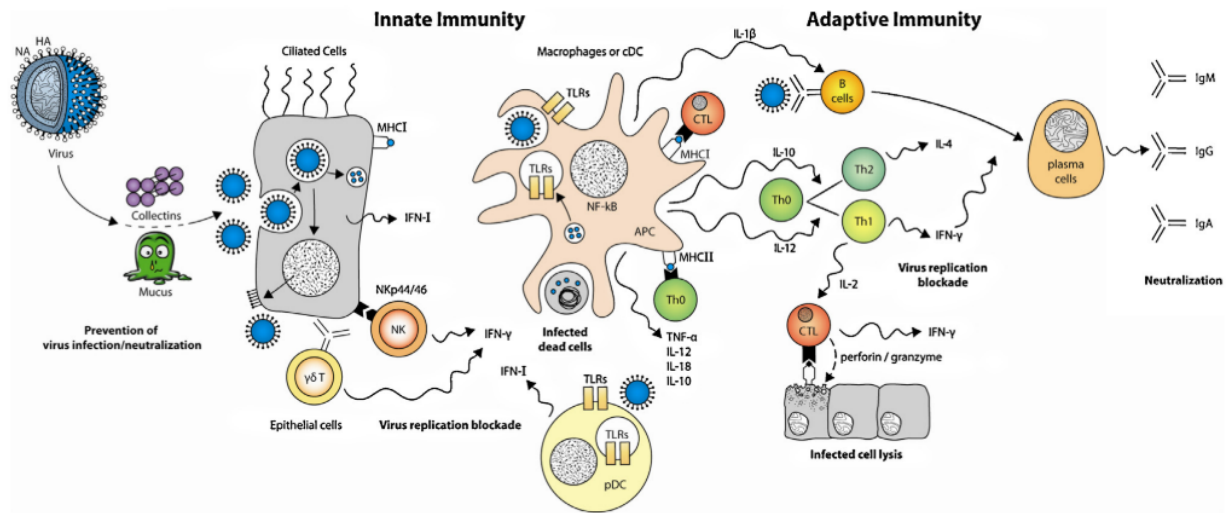


Figure 26 : Réponse immunitaire mise en place lors d'une infection IAV chez les mammifères (Crisci et al., 2013)

3.5.1.1 Barrière physique

Le premier mécanisme de défense contre les IAV se trouve être l'appareil mucociliaire. Celui-ci est constitué de cils vibratiles présents à la surface des cellules épithéliales ciliées et de mucus. Le mucus respiratoire est constitué de cellules, de débris cellulaires et de polypeptides, qui sont reliés par la glycoprotéine « mucine » sécrétée par les cellules caliciformes et les glandes sub-mucosales des voies respiratoires (Starbæk et al., 2018). Le mucus va assurer une protection supplémentaire de la muqueuse en créant une barrière semi-perméable permettant l'échange de nutriments, d'eau et de gaz tout en étant imperméable à la plupart des agents pathogènes (Vareille et al., 2011). Les deux glycoprotéines sécrétées MUC5B et MUC5AC sont les principales composantes de la couche de mucus des voies respiratoires supérieures de l'Homme et du porc. D'autres composants importants du mucus ont été décrits tels que le MUC1, la protéine surfactante de type D (SP-D), le lysozyme et la lactoferrine (Starbæk et al., 2018), des cytokines et des immunoglobulines A (Vareille et al., 2011). La protéine SP-D est capable de se lier à la HA via des acides sialiques qu'elle contient, et d'inhiber l'activité de la NA (Hillaire et al., 2011; Starbæk et al., 2018; van Eijk et al., 2004). Les particules infectieuses piégées dans le mucus, et les cils des cellules épithéliales à travers leurs battements synchrones, vont permettre leur évacuation vers le pharynx. Le mucus contenant les particules infectieuses est alors expectoré ou dégluti (Dubin

et al., 2004; Ermund et al., 2017; Ganesan et al., 2013). Cependant, la surproduction de mucines et la formation excessive de mucus peuvent entraîner l'obstruction des voies respiratoires et l'exacerbation de troubles préexistants des voies respiratoires, transformant un système de défense inné en mécanisme nuisible (Vareille et al., 2011).

3.5.1.2 Les effecteurs de l'immunité innée

3.5.1.2.1 La voie de l'IFN

Après avoir franchi la couche de mucus et infecté soit les cellules épithéliales ou des macrophages alvéolaires, la réponse immunitaire innée antivirale prend le relais. Le virus est reconnu par la cellule hôte via des récepteurs PRR qui vont reconnaître principalement l'ARN viral. Ceci va permettre d'enclencher des cascades de signalisation antivirale entraînant la production d'IFN, de cytokines et de chimiokines (McKellar et al., 2021; Sanders et al., 2011). La principale voie de l'immunité antivirale innée est la réponse IFN-I (IFN- α et β).

Les voies de signalisation ont été développées plus en détail dans la partie 2.5.1 de ce manuscrit de thèse.

Les swIAV sont reconnus comme étant de forts inducteurs d'IFN (Crisci et al., 2019). Les études transcriptionnelles du système respiratoire du porc après une infection par des swIAV signalent une induction d'IFN et d'ISG (Delgado-Ortega et al., 2014; Dobrescu et al., 2014; Provost et al., 2017; Saade et al., 2020b). Il a été observé que la transcription des récepteurs TLR3, TLR7, RIG-I et MDA5 est régulée à la hausse dans les poumons de porcs (*in vivo*, *ex vivo*) en réponse aux infections par les virus H1N1 et H1N2 (Dobrescu et al., 2014; Saade et al., 2020b; Skovgaard et al., 2013). Également, il a été noté qu'une infection par le virus H3N2 induisait une augmentation de l'expression des ARNm de MyD88, MAVS, IRF7 et IRF3 dans les PAM (Zhang et al., 2015). Par ailleurs, l'infection à swIAV peut également induire une augmentation de protéines *Suppressor of cytokine signaling*, SOCS, qui vont pouvoir inhiber l'activation de la voie JAK/STAT (Delgado-Ortega et al., 2014).

3.5.1.2.2 Les cytokines pro/anti-inflammatoires et les protéines de la phase aiguë

Une augmentation de la concentration entre 2 et 4 jpi de TNF- α , IL-6 et IL-1 β entre 2 et 4 jpi swH1N1 (Pomorska-Mól et al., 2014c) et H1_{av}N1 (Pomorska-Mol et al., 2017) a été observée au niveau des tissus pulmonaires et de la trachée de porcs infectés. Au sein de notre équipe, il

a par la suite été observé une augmentation de la concentration d'IL-6 à 1 jpi au niveau systémique chez des porcs infectés par un virus H1_{hu}N2 (Deblanc et al., 2020). Une augmentation de la concentration d'IL-10 a été précédemment observée à 4 jpi swH1N1 au niveau pulmonaire (Pomorska-Mól et al., 2014c). Outre sa capacité à inhiber l'expression des cytokines pro-inflammatoires, l'IL-10 est capable d'intervenir dans l'immunité adaptative humorale en induisant la production d'IgM, IgG et IgA (Marcelletti and Katz, 1996).

Les cytokines proinflammatoires induisent des modifications des concentrations sanguines de certaines protéines dans les heures ou les jours qui suivent la stimulation (Fablet, 2009). Ces protéines sont regroupées sous le terme de « protéines de la phase aiguë » (PPA) et sont produites par le foie en réponse à l'activation des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6). Dans l'espèce porcine, la protéine C-Réactive (CRP), l'haptoglobine, la protéine Amyloïde Sérique A (SAA) et la *Pig-Major Acute Phase protein* (Pig-MAP), sont les principales PPA pour lesquelles les variations de concentration sont importantes après un stimulus. La protéine CRP participe à l'élimination des tissus endommagés, à l'activation de la voie du complément, à la régulation de la réponse inflammatoire, à l'opsonisation, au contrôle de la phagocytose ainsi qu'à la production de cytokines anti-inflammatoires. L'haptoglobine va se lier à l'hémoglobine plasmatique libre pour former un complexe stable empêchant ainsi son activation oxydative. Ce complexe est par la suite reconnu par les récepteurs CD163 qui l'éliminent par phagocytose. La SAA participe au transport du cholestérol vers le foie et le recrutement des cellules immunitaires aux sites de l'inflammation (Fablet, 2009). Les fonctions de la Pig-MAP sont encore inconnues (Veas, 2011). Chez des porcs inoculés par des H1_{hu}N2 (Pomorska-Mól et al., 2012), H1_{av}N1 (Pomorska-Mól et al., 2014c), swH1N1 (Pomorska-Mól et al., 2014c) ou H3N2 (Pomorska-Mól et al., 2014b), les concentrations sanguines de l'haptoglobine, du CRP et de la SAA augmentaient (figure 27).

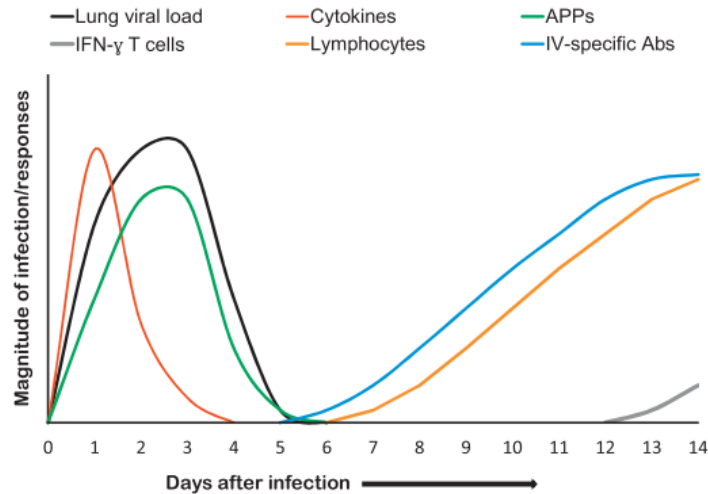


Figure 27 : Cinétique de la charge virale au niveau pulmonaire, de la production des PPA, des cytokines ainsi que des différents composants du système immunitaire (anticorps anti-swIAV, cellules productrices d'IFN- γ et les lymphocytes) au cours d'une infection par des swIAV (Crisci et al., 2013)

3.5.1.2.3 Les cellules de l'immunité innée

Lors d'une infection grippale, les macrophages alvéolaires s'activent et phagocytent les cellules infectées, ce qui limite la propagation virale chez le porc (Kim et al., 2008). Au-delà de leur activité phagocytaire, les macrophages alvéolaires peuvent avoir un effet délétère pour l'hôte. En effet, chez la souris, il a été montré que leur activation pouvait entraîner la production d'oxyde nitrique synthase 2 (NOS2) et de TNF- α aboutissant parfois à une pathologie pulmonaire (Van de Sandt et al., 2012). Les récepteurs NKp44 et NKp46 des cellules NK se lient aux protéines HA exprimées à la surface des cellules infectées par les IAV (Mendelson et al., 2010), pour les lyser (Mandelboim et al., 2001). Chez le porc, les cellules NK qui possèdent le récepteur NKp46 peuvent affluer vers les zones pulmonaires infectées par le virus H1N1pdm (Mair et al., 2016), notamment dans les trois premiers jours suivant l'infection (Reeves et al., 2014). Les NK peuvent également induire une mort cellulaire à travers la voie *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* ou ADCC (Kreijtz et al., 2011; Van de Sandt et al., 2012). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont capables de produire de fortes quantités d'IFN- α en réponse aux infections par des swIAV (Bel et al., 2011). D'autre part, le nombre de moDC/moM ϕ s (monocytes-derived macrophages) augmente notablement au niveau pulmonaire deux jours après l'infection à swIAV (Maisonasse et al., 2016). Les polynucléaires neutrophiles représentent la plus grande population de granulocytes circulants (les autres populations étant les éosinophiles et les basophiles). Ils ont un rôle important dans la phagocytose et sont massivement attirés sur

le lieu d'une infection à swIAV (Crisci et al., 2019). Des études réalisées chez le porc au sein de notre laboratoire ont montré un afflux au niveau pulmonaire, de neutrophiles 1 à 2 jpi H1N1 (Deblanc et al., 2016) et de granulocytes à 7 jpi H1_{hu}N2 (Deblanc et al., 2020).

3.5.2 Immunité adaptative

3.5.2.1 Réponse immunitaire à médiation humorale

Les anticorps jouent un rôle clé dans l'immunité protectrice contre les swIAV. La réponse à médiation humorale contre les swIAV se concentre principalement sur les protéines HA, NA, M et NP (Van de Sandt et al., 2012).

Les anticorps neutralisants anti-HA, en se liant à la tête globulaire de la protéine, ont pour fonction d'inhiber l'entrée du virus dans la cellule hôte en bloquant la liaison avec le récepteur, en inhibant la fusion de la membrane virale ou en interférant avec la sortie des virions (Guthmiller et al., 2021). Chez le porc, les anticorps anti-HA sont détectés à 7-10 jpi dans le sérum avec des titres atteignant leur maximum au bout de 2-3 semaines (Larsen et al., 2000). Les anticorps dirigés contre la NA ciblent en grande partie le domaine de la tête globulaire et inhibent les propriétés enzymatiques de la protéine, empêchant ainsi la libération des nouveaux virions (Krammer et al., 2018a). Ces anticorps anti-NA peuvent faciliter l'ADCC et contribuer à la clairance des cellules infectées par le virus (Mozdzanowska et al., 1999). De faibles niveaux d'anticorps anti-M2 sont produits suite à une infection à swIAV (Kitikoon et al., 2008). Les porcs possèdent également des anticorps dirigés contre la protéine NP (Heinen et al., 2000; Van Reeth et al., 2012). Ces anticorps sont présents au niveau de la muqueuse nasale, dans le sérum et dans les fluides des lavages broncho-alvéolaires (Van Reeth et al., 2012).

Après une infection à swIAV, des anticorps sériques d'isotypes IgM, IgG et IgA sont induits, mais suite à une seconde infection, la réponse IgM n'est pas observée (Van de Sandt et al., 2012). Les anticorps IgM peuvent neutraliser les swIAV, mais sont également capables d'activer la voie du complément (Fernandez Gonzalez et al., 2008; Jayasekera et al., 2007). Les anticorps IgG sériques diffusent vers les voies respiratoires et assurent une protection de longue durée (Murphy et al., 1982). Les anticorps IgA muqueux ou sécrétoires sont produits localement (Van de Sandt et al., 2012). Des taux importants d'IgA sont également présents dans le fluide des lavages broncho-alvéolaires des animaux infectés par swIAV (Kitikoon et al., 2006; Larsen et al., 2000).

3.5.2.2 Réponse immunitaire à médiation cellulaire

Les LT CD4⁺ et T CD8⁺ jouent, respectivement, un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire et la clairance virale (Van de Sandt et al., 2012).

Le détail des rôles des lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ a été développé dans la partie 2.5.2.2 de ce manuscrit de thèse.

Au niveau pulmonaire, il a été montré lors d'une infection à H1_{hu}N2, une légère augmentation des LT CD4⁺ entre 4 et 6 jpi et une augmentation des LT CD8⁺ entre 4 et 12 jpi (Talker et al., 2016). Il a également été mis en évidence que les cellules CD8⁺ migraient vers les poumons dès 6 jpi H1N1 (Edmans et al., 2020; Khatri et al., 2010). A la suite d'une infection H3N2, un pic de la population de cellules Th est observable entre 4 et 11 jpi et une infiltration massive de CTL à 8 jpi a pu conduire à une diminution du pourcentage de cellules NK à environ 11 jpi (Heinen et al., 2001). Au niveau systémique, au sein de notre laboratoire et dans d'autres laboratoires, une augmentation de la prolifération des PBMC spécifiques vis-à-vis de l'infection à swIAV à partir de 7jpi a été observée (Deblanc et al., 2020; Heinen et al., 2001; Pomorska-Mól et al., 2014a).

3.5.3 Mémoire immunitaire et protection croisée

A la suite d'une primo-infection, le système immunitaire met en place une immunité à long terme contre l'agent pathogène infectant.

Au sein des lymphocytes B, on peut distinguer plusieurs populations de cellules mémoires : 1) les cellules B mémoires (MBC, *memory B cells*), généralement générées par le centre germinatif, qui ont la capacité de proliférer et se différencier rapidement en plasmocytes en réponse à l'antigène, ce qui va permettre la sécrétion d'anticorps, et 2), les plasmocytes à longue durée de vie (LLPC, *long-lived plasma cells*), résidant dans la moelle osseuse, qui sont capables de sécréter des anticorps de manière constitutive mais qui ne prolifèrent pas. Après une réexposition à un IAV, les MBC résidant dans les poumons vont se différencier en plasmocytes, fournissant *in situ* des IgG et IgA qui vont par la suite neutraliser rapidement le virus (Auladell et al., 2019).

Après l'élimination des IAV du poumon, la grande majorité des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ effectrices disparaissent. Les lymphocytes restant correspondent aux lymphocytes T mémoires (Pizzolla and Wakim, 2019). Les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ mémoires peuvent être subdivisées en trois sous-ensembles appelés cellules T à mémoire centrale (*Central memory T cells* (T_{cm})), cellules T à mémoires effectrices (*Effector memory T cells* (T_{em})) et cellules T

mémoires résidentes (*tissue-resident memory T cell* (T_{rm})) (Pizzolla and Wakim, 2019). La réponse mémoire comprend plusieurs phases distinctes séparées dans le temps et dans l'espace. La première phase est assurée par les T_{rm} dans les voies respiratoires (Woodland and Randall, 2004). Les cellules T_{rm} , situées le long des voies respiratoires, fournissent une défense de première ligne, en diminuant rapidement les titres viraux et en augmentant les taux de survie à la suite d'une infection secondaire hétérologue par les virus grippaux (Pizzolla and Wakim, 2019). Ces cellules sont capables de répondre aux premiers signes d'infection lorsque les charges virales sont très faibles. Ces cellules peuvent produire des cytokines susceptibles de limiter la réplication et la propagation du virus dans l'épithélium mais ne sont pas capables d'exercer une activité cytolytique. La seconde phase de la réponse est médiée par les T_{em} et T_{cm} qui sont rapidement recrutées dans les voies respiratoires au cours des premiers jours. La troisième phase est l'expansion des cellules T mémoire, induite par l'antigène, qui se produit dans les organes lymphoïdes secondaires, y compris les BALT (*Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*), les organes lymphatiques drainants et la rate. Ces lymphocytes T mémoires prolifèrent pendant plusieurs jours dans les organes lymphoïdes et ne sont recrutés dans les voies respiratoires pulmonaires qu'aux alentours du cinquième jour de l'infection (Woodland and Randall, 2004). Il a été montré que six semaines après l'inoculation swIAV, les cellules T mémoires CD4⁺ et CD8⁺ s'étaient accumulées dans le tissu pulmonaire. Ces cellules présentaient divers profils de cytokines ainsi qu'une réactivité *in vitro* contre des souches swIAV hétérologues (Talker et al., 2016). Bien que les cellules T_{cm} et T_{em} CD4⁺ et CD8⁺ soient capables de produire des cytokines lors d'une stimulation antigénique, elles peuvent proliférer et migrer rapidement dans les poumons après une ré-infection à IAV (Bingaman et al., 2005).

En général, les anticorps neutralisants les virus grippaux ont une spécificité de souche étroite. Par conséquent, lors d'une infection secondaire, ils confèrent une immunité protectrice inefficace contre des souches hétérologues (de sous-type et/ou lignage génétique différent de la première infection) (Altenburg et al., 2015). La variabilité des protéines internes des IAV étant moindre, il est supposé que l'immunité hétérosubtypique (ou immunité à large spectre) est principalement conférée par des réponses immunitaires contre les épitopes internes conservés et les cellules T CD8⁺ représentent les principaux médiateurs (Sridhar et al., 2013). Comme pour les protéines HA et NA, les épitopes internes, qui sont principalement reconnus par les cellules T, sont soumis à une pression sélective. Il a été démontré que de petites variations de séquence dans un épitope peuvent avoir un impact significatif sur la réponse

immunitaire contre un virus. Les cellules T spécifiques des virus grippaux sont principalement dirigées contre les protéines internes les mieux conservées. Talker et al., avaient mis en évidence que les lymphocytes T isolés à partir de PBMC ou de poumons des porcs infectés avaient des capacités de réactions croisées car ils étaient capables de réagir avec des variants antigéniques du virus auquel les porcs avaient été exposés, ou avec d'autres sous-types de swIAV, voire avec une nucléoprotéine virale recombinante uniquement (Talker et al., 2016).

3.6 Prévention et contrôle

Pour contrôler la propagation des swIAV, le nombre d'infection ultérieure devrait être réduit à moins d'un par animal infecté. Le nombre de reproduction de base ou R_0 , représente le nombre moyen de cas (ou de foyers) secondaires transmis par un animal (ou un élevage) infecté par le virus grippal au sein d'un troupeau entièrement sensible à l'infection (Salvesen and Whitelaw, 2021). Si cette valeur R_0 est inférieure à 1 (un animal infecté contamine moins d'un animal sensible), alors l'infection ne se propagera pas au sein du troupeau. Avec une valeur de R_0 de 14,8 les swIAV se répandront donc rapidement si aucun programme de contrôle n'est mis en œuvre (Cador et al., 2016). Par ailleurs, la persistance virale peut être fonction de la conduite en bandes de l'élevage (Cador et al., 2017). En effet, les conduites en flux tendu, avec une arrivée rapprochée d'individus sensibles, semblent favoriser cette persistance virale et donc les phénomènes de grippe récurrente. Les stratégies de lutte peuvent reposer sur deux approches différentes : i) être réactives, c'est-à-dire, qu'elles visent à éliminer une infection virale après une détection clinique (ex : biosécurité, gestion de l'élevage, etc.) ou ii) être proactives, c'est-à-dire, qu'elles visent à empêcher un agent pathogène de s'établir dans le troupeau et ainsi contrôler l'infection et ses conséquences zootechniques (ex : vaccination) (Salvesen and Whitelaw, 2021) (figure 28).

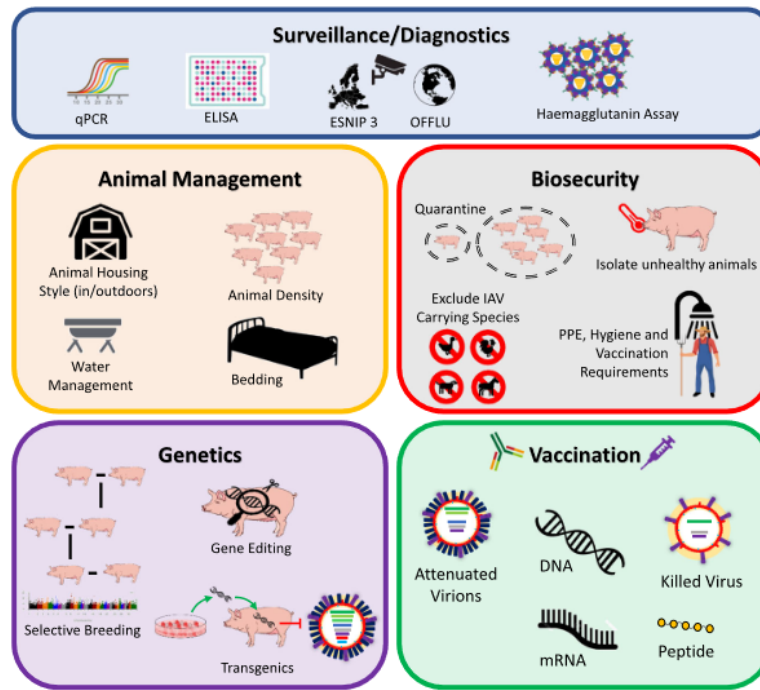


Figure 28 : Les stratégies actuelles et prospectives disponibles pour lutter contre les swIAV (Salvesen and Whitelaw, 2021)

3.6.1 Mesure de gestion

La gestion efficace des animaux permet d'éviter la transmission inter et intra-élevage (Salvesen and Whitelaw, 2021). Le contrôle des swIAV doit tenir compte de l'existence des élevages multi-sites. Ce système d'élevage nécessite des mouvements réguliers de porcs entre la maternité, le post-sevrage et l'engraissement. Le mouvement d'un animal infecté vers un troupeau naïf est une source d'infection primaire, et donc une fois que le statut « indemne » est atteint, l'objectif prioritaire est d'empêcher la réinfection. Pour réduire la probabilité que les swIAV s'établissent dans une population naïve à cause de nouveaux arrivants, il est recommandé de mettre en quarantaine les animaux avant de les faire rentrer dans l'élevage (Salvesen and Whitelaw, 2021). Les stratégies de contrôle de la biosécurité ne doivent pas se limiter aux porcs. Les travailleurs des exploitations porcines manipulent régulièrement les animaux et il existe un risque de transmission des swIAV entre les porcs et l'Homme, et inversement (Chastagner et al., 2019a; Chastagner et al., 2019b; Gray and Kayali, 2009). Le fait de limiter l'entrée dans les exploitations porcines aux seules personnes essentielles (vétérinaires, employés, fournisseurs, etc.), de veiller à mettre en œuvre une bonne hygiène ainsi qu'une vaccination antigrippale des personnels contribuerait à réduire le risque de transmission bidirectionnelle et l'émergence de nouvelles souches par transmission inter-

espèce (Ramirez et al., 2006). Quel que soit le système d'élevage, le fait de savoir d'où viennent les porcs reproducteurs, d'effectuer une mise en quarantaine des nouveaux arrivants et de maintenir de bonnes pratiques d'hygiène contribuera soit à garder l'élevage indemne, soit à limiter le risque d'introduction d'une nouvelle souche grippale. L'utilisation de polymorphismes génétiques chez les reproducteurs qui confèrent une résistance aux swIAV peuvent également servir de base à la diffusion de la résistance par l'élevage (Yan et al., 2014).

3.6.2 Vaccination

Les mesures de contrôle sont plus efficaces lorsqu'elles sont appliquées de manière préventive pour empêcher l'établissement des swIAV, plutôt que de manière rétrospective pour éliminer un foyer (Chamba Pardo et al., 2018; Mastin et al., 2011). Les programmes de vaccination des porcs sont spécifiques aux souches porcines enzootiques et n'empêchent pas les souches aviaires ou humaines d'infecter les porcs. Contrairement à d'autres espèces comme l'Homme ou le cheval, il n'existe pas de système officiel de recommandation de souches à inclure pour les vaccins swIAV chez le porc. Les technologies vaccinales approuvées et testées pour les porcs sont divisées en deux grands principes : les vaccins non réplicatifs, qui sont considérés comme étant une approche plus sûre car l'absence de réplication élimine le risque de réassortiment, et les vaccins réplicatifs, qui peuvent se réassortir avec les souches circulantes sur le terrain (Mancera Gracia et al., 2020).

Concernant les vaccins non réplicatifs, les vaccins inactivés, constituent la méthode traditionnelle de lutte contre les swIAV. La plupart des vaccins actuels contre les swIAV contiennent des virus entiers inactivés avec un adjuvant pour une injection intramusculaire et sont utilisés soit chez les truies pour les protéger pendant la gestation, soit chez les porcs en croissance pour réduire les signes cliniques (Van Reeth K et al., 2016). L'objectif de ces vaccins est d'induire des anticorps sériques neutralisants qui ciblent la protéine HA virale. En Europe, des vaccins bivalents contenant les sous-types H1_{av}N1 et H3N2 ont été commercialisés à la fin des années 1980. Aujourd'hui, certains de ces vaccins sont encore commercialisés dans différents pays, dont l'Italie et l'Espagne. En 2010, un vaccin trivalent Respi porc Flu 3 contenant également le sous-type H1_{hu}N2 a été autorisé en France. Le vaccin le plus récent disponible en Europe est un vaccin monovalent H1N1pdm09 autorisé en 2017 (Mancera Gracia et al., 2020). Néanmoins, une étude a démontré que ce vaccin monovalent contre le H1N1pdm09 ne confère pas une protection complète face à un challenge avec une

souche H1N1pdm09 antigéniquement distante (Everett et al., 2019). A la fin des années 2000, l'émergence du virus H1N1pdm09 chez le porc et l'Homme a mis en évidence la nécessité d'une stratégie d'immunisation rapide face aux épidémies de grippe. Les approches suivantes n'ont pas conduit à des vaccins commerciaux pour le moment. Les *Alphavirus replicon particles* contenant des segments de gènes structuraux des swIAV ont été incluses dans cette stratégie. Les *Alphavirus replicon particles* sont des vecteurs à cycle unique, ayant une faible capacité de propagation, qui délivrent du matériel génétique dans le cytoplasme de la cellule sans pouvoir se propager de cellule en cellule (Erdman et al., 2010). Une étude a mis en évidence, après un challenge homologue, que des porcs vaccinés présentaient une quantité réduite d'ARN viral dans les écouvillons nasaux et les BALF, ainsi qu'une réduction des signes cliniques et des lésions pulmonaires macroscopiques et histologiques (Bosworth et al., 2010). Une autre stratégie de vaccination explorée chez le porc est l'utilisation de l'adénovirus humain de sérotype 5 (Ad5) comme vecteur. Cette technologie repose sur la création d'un phénotype défectueux du point de vue de la réplication avec la possibilité d'insérer d'autres gènes d'intérêt. Dans une étude, les gènes HA et NP d'un swIAV H3N2 ont été insérés dans un Ad5 afin de tester l'efficacité vaccinale chez le porc (Wesley et al., 2004). Une dose intramusculaire d'Ad5-HA seul ou combiné avec Ad5-NP a induit des niveaux élevés d'anticorps anti-HA. Les porcs vaccinés Ad5-HA + Ad5-NP ont été complètement protégés contre une infection hétérologue (absence d'excrétion virale et de lésions pulmonaires). Concernant les vaccins à ADN, leur exploration a commencé dans les années 1990. Ces vaccins consistent à cloner dans un plasmide d'expression non répliatif, un gène codant pour un antigène, plasmide qui est par la suite délivré à l'hôte. Cette technique offre l'avantage de pouvoir combiner plusieurs antigènes dans un seul plasmide et de générer une immunité à médiation cellulaire et humorale, même en présence d'AOM (Mancera Gracia et al., 2020). Ces vaccins ont montré de bons degrés de protection contre les challenges homologues (Gorres et al., 2011; Karlsson et al., 2018; Sisteré-Oró et al., 2019).

Concernant les vaccins répliatifs, il existe les vaccins vivants atténués (*Live attenuated Influenza Vaccines* (LAIV)) qui sont des virus dont les capacités de réplication ont été diminuées par manipulation de certains gènes (Mancera Gracia et al., 2020). Ces vaccins, dont la production n'est pas autorisée en France et qui a été stoppée aux Etats-Unis, sont administrés directement au niveau de la muqueuse respiratoire par voie intranasale, ce qui permet d'imiter l'infection naturelle et d'activer les réponses immunitaires locales et systémiques. Les anticorps au niveau des muqueuses, tels que les IgA, sont importants pour le

contrôle des infections à swIAV, et la réponse immunitaire à médiation cellulaire induite par les LAIV est essentielle pour une protection croisée plus large contre l'infection naturelle, car les cellules T reconnaissent principalement des épitopes conservés. Deux stratégies différentes de LAIV ont été testées chez le porc, l'atténuation par troncature de la protéine NS1 et l'atténuation par des mutations des gènes de la polymérase (Mancera Gracia et al., 2020).

Les nouvelles stratégies de lutte contre les swIAV sont axées sur l'amélioration de la réponse immunitaire de l'hôte par le biais d'adjuvants optimisés afin de renforcer l'efficacité des vaccins (Rajão and Pérez, 2018).

La mise en œuvre de mesures de contrôles efficaces visant à réduire la propagation intra-espèce et inter-espèce des swIAV permettra d'améliorer les performances économiques de la production porcine, d'améliorer la santé des éleveurs et des porcs et d'éliminer le risque que les porcs servent de réservoir pour les souches émergentes de swIAV.

4 LES INTERACTIONS VIRALES et BACTERIENNES dans un CONTEXTE de CO-INFECTIONS IMPLIQUANT le SDRPV et/ou les swIAV

Les co-infections respiratoires ont un rôle important dans le complexe respiratoire porcin (Opriessnig et al., 2011). Plusieurs études ont montré la présence simultanée, ou potentiellement simultanée, d'au moins deux agents pathogènes chez des porcs présentant des signes cliniques respiratoires en élevage ou des lésions pulmonaires à l'abattoir (Choi et al., 2003; Fablet et al., 2012a; Fablet et al., 2012b). De nombreuses études *in vivo* ont été menées pour comparer la sévérité des signes cliniques et des lésions pulmonaires (microscopiques/macrosopiques) lors de co-infections, à celles observées lors de mono-infections (Saade et al., 2020a), et une aggravation des signes cliniques étaient globalement observée (figure 29).

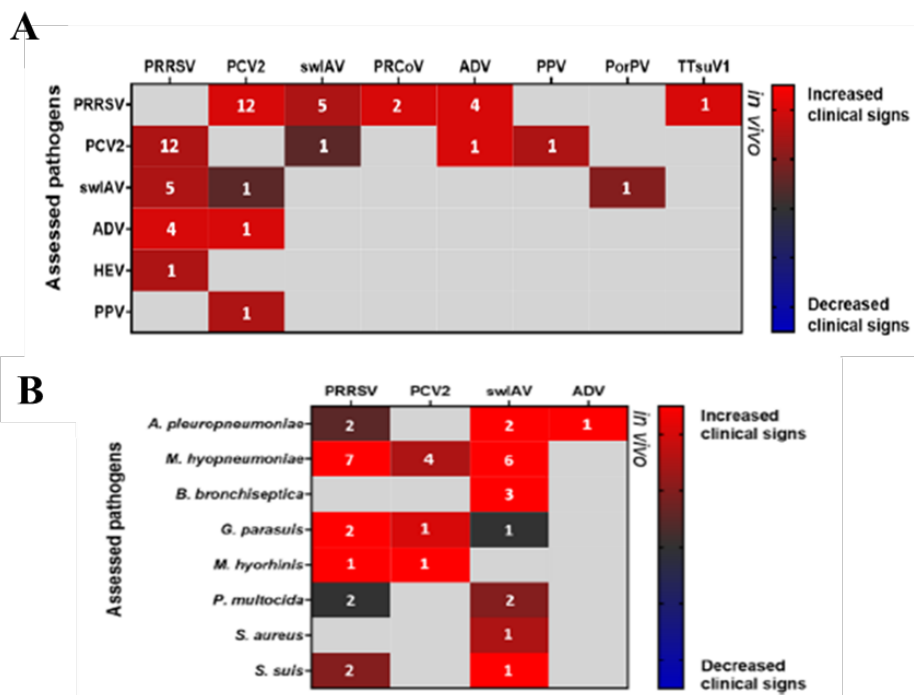


Figure 29 : Impact des co-infections sur les signes cliniques dans le contexte du CRP. A) Co-infection virus/virus. B) Co-infection virus/bactéries. Les chiffres indiqués sur la figure correspondent au nombre d'études identifiées pour la même combinaison de pathogènes (Saade et al., 2020a).

Dans ce chapitre sont rapportées les études expérimentales réalisées chez le porc et les études *in vitro/ex vivo* concernant les co/super-infections virus/virus et virus/bactérie impliquant le SDRPV (section 4.1), ou les swIAV (section 4.2) ou le SDRPV et les swIAV (section 4.3). Pour plus de références impliquant les autres agents pathogènes, voir la revue « **Coinfections**

and their molecular consequences in the porcine respiratory tract » (Saade et al., 2020a) donnée en annexe de ce mémoire (page 194).

L'issue d'une co-infection est variable selon l'antagonisme, la neutralité ou la synergie qui peut exister entre les agents infectieux.

Si l'on considère les interactions virus/virus, l'une des conséquences de la co-infection peut être « l'interférence virale », situation dans laquelle un virus interfère avec la réplication d'un autre en rendant les cellules résistantes à la super-infection. Le système d'interférence virale le plus courant est indirect et repose sur la production d'IFN de type I et III, pouvant ainsi bloquer de manière non spécifique la réplication des virus (McNab et al., 2015 ; Zhou et al., 2018). Des mécanismes d'interférence virale non médiée par l'interféron (ou interférence intrinsèque) existent et correspondent à un état cellulaire de résistance induit par le virus à une nouvelle infection virale par des virus proches ou non apparentés (Marcus et al., 1977). Les mécanismes sous-jacents à cette interférence intrinsèque peuvent par exemple être liés à la compétition entre virus pour les métabolites ou les facteurs de l'hôte nécessaires à la multiplication (Saade et al., 2020).

A l'inverse, dans certaines situations, les co-infections virales peuvent directement ou indirectement entraîner une augmentation de la réplication et de la virulence pour l'un ou les deux agents pathogènes. Dans d'autres cas, la co-infection n'a pas d'effet sur la réplication des virus. Ainsi, les virus peuvent coexister dans une relation dite d'accommodation (Kumar et al., 2018).

Les interactions bactéries/virus peuvent avoir un impact positif ou négatif sur les deux agents pathogènes selon les espèces bactériennes et virales impliquées. Différents mécanismes expliquant ces interactions bactéries/virus ont été identifiés. Habituellement, quand les interactions sont directes, elles favorisent l'infection virale sans affecter les bactéries. Un exemple d'interaction directe dans les voies respiratoires est le clivage de la protéine HA du swIAV en HA1 et HA2 par une protéase de *S. aureus* qui aide la particule virale à devenir infectieuse (Tashiro et al., 1987). Les interactions indirectes, donnent, à l'inverse, un avantage aux infections bactériennes (Qi et al., 2019), grâce notamment aux mécanismes d'altération virale de la barrière épithéliale, la réduction ou la suppression de la réponse immunitaire de l'hôte, l'altération du microbiome ou l'altération par le virus de l'expression des récepteurs cellulaires bactériens (Almand et al., 2017).

4.1 Co-infections virales ou bactériennes impliquant le SDRPV

Outre les swIAV, le SDRPV est couramment impliqué dans des co-infections avec d'autres agents pathogènes tels que PCV2, PRCoV, Mhp, *A. pleuropneumoniae*, etc. (tableau 4 a, b). En fonction des souches virales, de l'âge ou de la génétique des porcs, le SDRPV semble être capable d'altérer les réponses immunitaires, favorisant ainsi la pathogénicité d'autres infections virales ou bactériennes. Les porcs infectés par le SDRPV sont généralement sensibles cliniquement à une infection bactérienne secondaire, notamment en raison de la destruction des macrophages (Thanawongnuwech et al., 2000). Une étude expérimentale a confirmé que des porcs pré-infectés par le SDRPV présentaient une exacerbation des lésions pulmonaires associées à la seconde infection par *Streptococcus suis* (Galina et al., 1994). Ce même résultat a été observé au cours d'une co-infection simultanée SDRPV/*Bordetella bronchiseptica* (Brockmeier et al., 2000). Au cours d'interactions virales impliquant le SDRPV, la co-infection SDRPV/PCV2 est fréquemment observée. En effet, le taux de co-infection SDRPV/PCV2 a été rapporté à 42% et jusqu'à 85,4% dans des poumons présentant des lésions de pneumonie proliférative et nécrosante chez les porcs sevrés (Ouyang et al., 2019). D'autres données ont mis en évidence que lors de co-infections impliquant le SDRPV, ce virus pouvait augmenter le titre du PCV2 (Sun et al., 2016), mais il peut aussi aggraver le score clinique associé à l'autre infection (Dong et al., 2015; Fan et al., 2013; Niederwerder et al., 2016) (tableau 4a). Egalement, même lorsque le SDRPV n'augmente pas la charge génomique d'un autre virus au cours d'une co-infection, comme cela a été noté pour les co-infections impliquant le PRCoV (Van Reeth et al., 1996) (tableau 4a), il peut aggraver les signes cliniques associés (Saade et al., 2020a).

Globalement, le SDRPV semble donc prédisposer les animaux à une surinfection, exacerber la clinique ainsi que les lésions liées à une infection simultanée ou subséquente, voire même prolonger la gravité et la durée de la pneumonie causée par l'agent pathogène secondaire.

Tableau 4a: Liste non exhaustive d'essais expérimentaux réalisés chez le porc afin d'étudier les co/super-infections SDRPV/virus et SDRPV/bactérie dans le contexte du CRP d'après Saade et al., 2020.

Agents pathogènes	Souches	Délai entre les inoculations	Voies d'inoculations	Dose inoculée	Statut des porcs	Résultats	Références
SDRPV/ PCV2	SDRPV-2: KS62 PCV2b: 06-06274	Simultanée	IN et IM	PCV2: $10^{3.6}$ TCID ₅₀ /ml SDRPV : 10^5 TCID ₅₀ /ml	conventionnel	Les porcs co-infectés présentant des signes cliniques sévères ont montré des charges génomiques SDRPV et PCV2 plus importantes, ainsi qu'une diversité microbienne plus faible.	(Niederwerder et al., 2016)
	SDRPV-2: HF6-7 PCV2: THF601-7	Simultanée	PCV2 : IN et IM SDRPV : IN	10^6 TCID ₅₀ /ml	EOPS	Signes cliniques et lésions pulmonaires plus sévères au cours de la co-infection SDRPV/PCV2 chez le porc.	(Dong et al., 2015)
	SDRPV-2: HBR PCV2b : YJ	7jours ou simultanée	IN et IM	$10^{4.5}$ TCID ₅₀ /ml	conventionnel	Les porcs SDRPV/PCV2 montrent des scores cliniques plus importants que les porcs PCV2/SDRPV. Les porcs PRRSV/PCV2 montrent une charge génomique plus importante avec des titres d'anticorps plus faibles.	(Fan et al., 2013)
SDRPV/ PRCoV	SDRPV-2: SD23983 PRCoV: ISU-1	SDRPV-10j- PRCoV	SDRPV : IN et IM PRCoV: IN et IT	SDRPV: 3 et 2×10^4 TCID ₅₀ /mL PRCoV: 4 et 6×10^6 PFU	conventionnel	Les porcs co-infectés présentent des cliniques plus sévères que les autres animaux. Les porcs co-infectés présentaient une forte production d'IL-6, d'IL-10 et de TGF- β , comparativement aux autres porcs, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules myéloïdes et des lymphocytes CD4+CD8+.	(Renukaradhy et al., 2010)
	SDRPV-1 : Lelystad PRCoV : 91V44	SDRPV-3j- PRCoV	aérosol	SDRPV : $10^{4.9}$ TCID ₅₀ PRCoV : 10^7 TCID ₅₀	conventionnel	Des signes cliniques plus sévères ont été observés chez les porcs co-infectés comparativement aux autres animaux. L'excretion du PRCV n'a été impacté par le SDRPV.	(Van Reeth et al., 1996)
Mhp/ SDRPV	SDRPV-2 : VR2385 Mhp : 232	Simultanée	IN	SDRPV : $10^{4.9}$ TCID ₅₀ /mL Mhp : 10^5 CCU /mL	conventionnel (crossbred)	Une augmentation de la clinique respiratoire et une clairance virale plus lente ont été observées chez les porcs co-infectés, ainsi qu'une augmentation des niveaux d'IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12 et TNF- α .	(Thanawongnuwech et al., 2004b)

Tableau 4b : Liste non exhaustive d'études *in vitro* de co/super-infections SDRPV/virus d'après Saade et al., 2020.

Souches	Délai d'inoculation	Dose inoculée	Cellules	Résultats	Références
SDRPV-2: tw91 PCV2: local strain	Simultanée	MOI = 0.1	PAM	La mort cellulaire ainsi que l'apoptose sont réduites dans les conditions de co-infections comparativement aux conditions de mono-infections. La réduction de l'infectiosité du SDRPV par le PCV2 semble être relié à une augmentation de la production d'IFN- α	(Hui-Wen Chang et al., 2005)
SDRPV-2: NJGC Mhp: XLM-2	SDRPV-1h-Mhp	SDRPV : MOI = 0.01 Mhp : 5×10^8 CCU/ml	PAM	Mhp diminue la réplication du SDRPV à 24hpi. Il a été observé une augmentation de la production d'IL-1 β , IL-8 et IL-10 dans les conditions de co-infection.	(Thanawongnuwech et al., 2001)

IN: intranasale, IM: intramusculaire; EOPS : Exempt d'organismes pathogènes spécifiés ; IT: intratrachéale; PFU: plaque-forming units; CCU: color-changing unit; TCID₅₀: 50% Tissue Culture Infectious Dose. Mhp : *M. hyopneumonia*

4.2 Co-infections virales ou bactériennes impliquant les swIAV

Chez le porc, une co-infection swIAV/PCV2 peut entraîner une affection respiratoire plus sévère, comparativement aux animaux mono-infectés PCV2, mais l'infection par le swIAV n'influencerait pas la réplication du PCV2 (Wei et al., 2010) (tableau 5a). Cependant, l'absence de groupe mono-infecté swIAV dans cette étude ne permet pas de savoir si le PCV2 peut avoir un impact sur l'infection à swIAV. Une autre étude ciblant la co-infection swIAV/PRCoV avait montré une diminution de l'excrétion nasale et de la multiplication pulmonaire du swIAV au cours de la co-infection, comparativement à la mono-infection swIAV (Van Reeth and Pensaert, 1994) (tableau 5a). En parallèle, une récente étude *in vitro*, a montré que le swIAV pouvait avoir la capacité d'inhiber complètement la réplication du PRCoV lorsque l'intervalle de temps entre les deux inoculations était court (Peng et al., 2021), ce qui rejoint ce qui a été observé *in vivo* dans cette même étude (tableau 5b).

Concernant les co-infections swIAV/bactéries, les cas de co-infections simultanées swIAV/*B.bronchiseptica* ont montré une augmentation de la sévérité des lésions pulmonaires, une augmentation de la production d'IFN- α et d'IL-8 (Kowalczyk et al., 2014) (tableau 5a). Dans un autre modèle de co-infection simultanée tel que swIAV/*P. multocida* (Pomorska-Mól et al., 2013), des signes cliniques plus marqués et une production de protéines de la phase aigüe plus importante ont été rapportés, comparativement aux mono-infections. L'infection par un swIAV prédispose l'hôte à des surinfections bactériennes en altérant la barrière épithéliale respiratoire et en augmentant l'expression des récepteurs cellulaires, favorisant l'adhésion bactérienne et modifiant les réponses immunitaires de l'hôte (McCullers, 2014). Le modèle expérimental le plus étudié est celui de la co-infection swIAV/Mhp (Deblanc and Simon, 2017). Cette bactérie va induire une maladie respiratoire chronique et va influencer par la suite l'issue d'une infection virale ultérieure. Cependant, une infection à mycoplasme doit être déjà bien établie dans les voies respiratoires au moment de l'infection virale pour la potentialiser. En effet, *M. hyopneumoniae* inoculé à des porcs simultanément ou peu de temps avant l'inoculation swIAV n'a que peu d'impact sur la gravité de l'infection grippale (Yazawa et al., 2004). Une étude réalisée au sein de notre laboratoire a mis en évidence, une exacerbation des manifestations cliniques, un afflux de neutrophiles au niveau pulmonaire et une augmentation de la production d'IL-6, IL1- β et TNF- α lorsque l'inoculation des agents pathogènes se faisait à un intervalle de temps de 21 jours (Deblanc et al., 2012) (tableau 5a). Cette aggravation semble être le résultat d'un effet additif des deux agents pathogènes plutôt qu'une synergie (Deblanc et al., 2016) (tableau 5a).

Tableau 5a : Liste non exhaustive d'essais expérimentaux réalisés chez le porc afin d'étudier les co/super-infections swIAV/virus et swIAV/bactérie dans le contexte du CRP d'après Saade et al., 2020.

Agents pathogènes	Souches	Délai d'inoculation	Voie d'inoculation	Dose inoculée	Statut des porcs	Résultats	Références
SwIAV / PCV2	PCV2 : ADDLPP 10069 swIAV : H1N1	PCV2-7j-swIAV	IT	PCV2: 1.6×10^5 TCID ₅₀ /ml swIAV: 2×10^7 pfu/ml	CDCD	L'infection par le swIAV n'affecte pas la réplication du PCV2. Pas de différence du taux d'anticorps anti-PCV2 en présence de swIAV.	(Wei et al., 2010)
SwIAV / PRCoV	SwIAV: H1N1 et H3N2 PRCoV : Stopps strain (135308)	simultanée	IN et aérosol	swIAV: 10^5 TCID ₅₀ /ml PRCoV: 10^8 EID ₅₀ /ml	EOPS	La co-infection swIAV/PRCoV n'augmente pas la pathogénicité des virus. Pour les porcs co-infectés, les virus ont été isolés moins fréquemment dans les tissus et les écouvillons nasaux (excrétion nasale plus courte), comparativement aux porcs mono-infectés, suggérant ainsi une possible interférence entre la réplication du PRCoV et celle des swIAV.	(Lanza et al., 1992)
	SwIAV: H1N1 PRCoV: Local field strain	PRCoV-2j ou 3j-swIAV	aérosol	PRCoV: 10^7 TCID ₅₀ /ml swIAV: $10^{7.5}$ EID ₅₀ /ml	conventionnel	Le PRCoV diminue l'excrétion du swIAV et sa réplication au niveau pulmonaire au cours de la co-infection.	(Van Reeth and Pensaert, 1994)
SwIAV / Mhp	SwIAV : H1N1 et H1N2 Mhp :116	Mhp-21j-swIAV	IT	swIAV: 5×10^5 EID ₅₀ /porc Mhp: 5×10^8 CCU/porc	EOPS	L'infection Mhp augmente le score des lésions macroscopiques au cours de la co-infection Mhp/H1N1, mais pas au cours de la co-infection Mhp/H1N2. La réponse à médiation humorale vis-à-vis du H1N2 est plus élevée pour les porcs co-infectés Mhp/H1N2 que pour les porcs mono-infectés H1N1 à 7jpi swIAV	(Deblanc et al., 2012)
	SwIAV : H1N1 Mhp :116	Mhp-21j-swIAV	IT	swIAV: 5×10^5 EID ₅₀ /porc Mhp: 5×10^8 CCU/porc	EOPS	Les porcs co-infectés ont présenté un afflux plus précoce de cellules CD163+ dans les lobes cardiaques, un afflux plus important de neutrophiles et une augmentation de cytokines pro-inflammatoires au niveau pulmonaire, comparativement aux porcs mono infectés H1N1	(Deblanc et al., 2016)
SwIAV / <i>A.pl</i>	SwIAV : H1N1 App : 4226 sérotype 2	Simultanée	IN	swIAV: 10^7 TCID ₅₀ /porc Mhp: 3.9×10^8 cfu/porc	conventionnel	Les signes cliniques sont plus sévères pour les porcs co-infectés Augmentation des concentrations d'IL-1 β , IL-8, IFN- α au niveau pulmonaire chez les porcs co-infectés	(Czyżewska-Dors et al., 2017)
SwIAV / <i>B.br</i>	SwIAV : H1N1 Bb : KM22	Simultanée	IN	swIAV: $10^{7.3}$ TCID ₅₀ /porc Bb: 1.7×10^8 cfu/ml	conventionnel	Les porcs co-infectés ont présenté, une augmentation de la sévérité des lésions pulmonaires, une augmentation de la production d'IFN- α et IL-8 dans les poumons	(Kowalczyk et al., 2014)
SwIAV/ <i>P.mul</i>	SwIAV : H1N1 Pm : field strain	Simultanée	IN	swIAV: $10^{7.3}$ TCID ₅₀ /porc Pm: 3×10^8 cfu/porc	conventionnel	Les porcs co-infectés ont présentés des lésions pulmonaires macroscopiques avec une production de CRP, haptoglobine, SAA et Pig-MAP plus importantes que les porcs mono-infectés	(Pomorska-Mól et al., 2013)

Tableau 5b : Liste non exhaustive d'études *in vitro/ex vivo* de co/super-infections swIAV/virus d'après Saade et al., 2020.

Souches	Délai d'inoculation	Dose inoculée	Cellules/tissus	Résultats	Références
swIAV: H1N1 et H3N2 PRCoV: Bel85	Simultanée	MOI = 1	PCLS et NPTr	Les titres viraux dans les conditions de co-infections étaient plus faibles que dans les conditions de mono-infections. Au cours des mono-infection swIAV et co-infection swIAV/PRCoV, il a été noté des effets plus importants de l'activité ciliaire comparativement à la mono-infection PRCoV.	(Krimmling and Schwegmann-Wessels, 2017)
swIAV: H3N2 PRCoV: Bel85	Simultanée, 3j, 7j	swIAV: 4×10^4 FFU PRCoV: 1×10^3 FFU	PTEC	Avec un intervalle de temps court, la primo infection IAV a entraîné une inhibition complète de l'infection par le PRCoV, tandis que dans des intervalles de temps long, une certaine réplication du PRCoV est détectable. A l'inverse, la primo-infection PRCoV n'a entraîné qu'une légère inhibition de la réplication de l'IAV.	(Peng et al., 2021)

EID₅₀: 50% embryonic infectious dose; *A. pl*: *A. pleuropneumoniae*; *B. br*: *B. bronchiseptica*; *P. mul*: *P. multocida*; CDCD: Cesarean-derived colostrum-deprived; IT: intratrachéale; pfu: plaque-forming unit, cfu: colony-forming unit; PTEC: proximal tubule epithelial cells.

4.3 Co-infections SDRPV/swIAV

Les infections par le SDRPV et le swIAV sont répandues dans les élevages porcins en France. En effet, plus de la moitié des 125 troupeaux étudiés au cours d'une étude épidémiologique dans le Grand-Ouest étaient séropositifs pour l'un ou l'autre de ces agents viraux (Fablet et al., 2012a). En Bretagne, des enquêtes épidémiologiques menées dans des exploitations porcines ont montré que le statut séropositif vis-à-vis de l'infection par le swIAV H1_{hu}N2, et non H1_{av}N1, était significativement associé au statut séropositif vis-à-vis de l'infection par le SDRPV (Fablet et al., 2012a). Dans les zones de production où le SDRPV et le swIAV sont répandus, il existe un risque élevé que les exploitations porcines soient infectées par les deux virus en même temps (Fablet et al., 2012a; Fablet et al., 2011). Cependant, très peu d'études ont analysé l'impact de la co-infection SDRPV/swIAV chez les porcs (tableau 6a). Ces études se sont principalement concentrées sur les paramètres cliniques et virologiques, et avaient des résultats non concordants. Par exemple, certaines signalaient des exacerbations des lésions pulmonaires lors d'une co-infection simultanée SDRPV/swIAV (Kitikoon et al., 2009), ou lorsque le SDRPV était inoculé 3 ou 7 jours avant l'inoculation swIAV (Van Reeth et al., 1996, 2001), mais pas lorsque le SDRPV était inoculé 14 jours avant le virus grippal (Van Reeth et al., 2001). Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés sur des porcs EOPS (Pol et al., 1997), ou sur des porcs CDCD (*caesarean-derived colostrum-deprived*) (Van Reeth et al., 2001) (tableau 6a). De plus, une récente étude de co-infection SDRPV/swIAV n'a montré aucune différence de signes cliniques, dans la réplication virale au niveau pulmonaire et dans la réponse à médiation humorale vis-à-vis des deux virus entre des porcs conventionnels co-infectés simultanément et des porcs mono-infectés (Pomorska-Mol et al., 2020), contrairement à une autre étude réalisée dans les mêmes conditions et où les porcs co-infectés présentaient une diminution de la charge génomique du SDRPV au niveau pulmonaire ainsi qu'une augmentation des réponses pro et anti inflammatoire (IL-6 et IL-10, respectivement), comparativement aux porcs mono-infectés SDRPV (Czyżewska-Dors et al., 2019) (tableau 6a). En outre, les réponses immunitaires de l'hôte n'ont été étudiées que dans une mesure très limitée au niveau systémique ou pulmonaire. En parallèle, seul un nombre restreint d'études *in vitro* a évalué, au niveau moléculaire, les conséquences de la co-infection SDRPV/swIAV dans les cellules cibles de ces deux virus (tableau 6b). Au cours de ces études *in vitro*, il a été mis en évidence l'existence d'une possible interaction virale entre le SDRPV et le swIAV, avec notamment une diminution de la multiplication du swIAV lorsque le SDRPV était inoculé en même temps ou peu de temps avant le swIAV (Dobrescu et al., 2014; Provost et

al., 2017; Saade et al., 2020b), ainsi qu'une diminution de la multiplication du SDRPV lorsque le swIAV était inoculé 3h avant le SDRPV (Provost et al., 2017). Une altération de la voie de l'IFN a été également observée au cours d'une co-infection SDRPV/swIAV *in vitro*, avec notamment une inhibition d'IFN-I, RIG-I, Mx1 et Mx2 (Saade et al., 2020b). Compte tenu des lacunes et des contradictions apparentes entre ces études antérieures, de nouvelles recherches semblent être nécessaires pour mieux caractériser l'effet qu'une infection virale peut avoir sur l'autre, ainsi que l'impact de la co-infection SDRPV/swIAV sur les réponses immunitaires de l'hôte.

Tableau 6a : Liste non exhaustive d'essais expérimentaux réalisés chez le porc afin d'étudier les co/super-infections SDRPV/swIAV dans le contexte du CRP (*in vivo*) d'après Saade et al., 2020.

Souches	Délai d'inoculation	Voie d'inoculation	Dose inoculée	Statut des porcs	Résultats	Références
SDRPV-1 : PL15-33 swIAV : H1N1	simultanée	IN	SDRPV : 10^5 TCID ₅₀ /porc swIAV : 10^7 TCID ₅₀ /porc	conventionnel	La co-infection PRRSV/swIAV n'a pas eu d'effet sur les signes cliniques, les lésions pulmonaires, les réponses immunitaires à médiation humorale et cellulaire et la réplication des virus au niveau pulmonaire.	(Pomorska-Mol et al., 2020)
SDRPV-1 : PL15-33 swIAV : H1N1	simultanée	IN	SDRPV : 10^5 TCID ₅₀ /porc swIAV : 10^7 TCID ₅₀ /ml	conventionnel	Des signes cliniques plus sévères ont été observés chez les porcs co-infectés. La charge génomique du SDRPV était plus importante chez les porcs mono-infectés SDRPV, comparativement aux porcs co-infectés. L'expression d'IL-6 et d'IL-10 a augmenté chez les porcs co-infectés, mais pas chez les porcs mono-infectés SDRPV.	(Czyżewska-Dors et al., 2019)
SDRPV-2 : VR2385 swIAV : H1N1	simultanée	SDRPV : IN swIAV : IT	SDRPV : $10^{5.6}$ TCID ₅₀ /ml swIAV : $10^{7.5}$ TCID ₅₀ /ml	conventionnel	Signes cliniques plus sévères chez les porcs co-infectés. Pas d'augmentation de l'excretion du swIAV chez les porcs co-infectés. Augmentation de la prolifération lymphocytaire après l'inoculation SDRPV.	(Kitikoon et al., 2009)
SDRPV-1 : Lelystad swIAV : H1N1	SDRPV-3, 7 ou 14j-swIAV	aérosol	SDRPV : $10^{7.5}$ TCID ₅₀ /porc swIAV : $10^{7.5}$ EID ₅₀ /porc	conventionnel et CDCD	L'intervalle de temps entre les deux infections pourrait affecter les résultats cliniques chez le porc. Des co-infections avec un intervalle de temps de 3 ou 7 jours semblent entraîner des symptômes aigus, tandis qu'un intervalle de 14 jours entre les deux inoculations semble entraîner une infection subclinique. Les différences entre les porcs co-infectés et les porcs mono-infectés semblent négligeables.	(Van Reeth et al., 2001)
SDRPV-1 : Lelystad swIAV : H3N2	SDRPV-7j- swIAV	aérosol	SDRPV : 10^6 TCID ₅₀ /ml swIAV : 10^3 cfu/ml	EOPS	La primo-infection SDRPV ne semble pas avoir d'effet sur l'infection swIAV chez le porc.	(Pol et al., 1997)
SDRPV-1 : Lelystad swIAV : H1N1	SDRPV-3j- swIAV	aérosol	SDRPV : $10^{4.9}$ TCID ₅₀ /porc swIAV : $10^{7.5}$ EID ₅₀ /porc	conventionnel	Il semblerait que la co-infection est conduit à des signes cliniques plus sévères que chez les porcs mono-infectés. La primo infection SDRPV semble avoir retardée l'excretion du swIAV de deux jours.	(Van Reeth et al., 1996)

Tableau 6b : Liste non exhaustive d'études *in vitro* sur les co/super-infections SDRPV/swIAV dans le contexte du CRP d'après Saade et al., 2020.

Souches	Délai d'inoculation	Dose inoculée	Cellules/tissus	Résultats	Références
swIAV : H1N1 SDRPV-2 : ISU-12-SAH	Simultanée et 3h	MOI = 5	NPT _r -CD163	Le SDRPV semble réduire la réplication de l'IAV lors de la co-infection simultanée et lorsqu'il a été inoculé 3h plus tard. L'IAV a réduit la réplication du SDRPV lorsqu'il est inoculé 3h avant. Les deux virus semblent interférer l'un avec l'autre. La primo infection par le SDRPV a moins d'effet que la primo infection IAV. Aucun effet synergique ou additif clair n'est observé.	(Provost et al., 2017)
swIAV : H1N1 SDRPV-2 : ISU-12-SAH	3h	MOI = 10	PAM et PCLS	Le SDRPV n'a pas modifié la réplication de l'IAV dans les PCLS mais a réduit sa réplication dans les PAM. L'infection IAV a modifié l'expression des ISGs.	(Dobrescu et al., 2014)
swIAV : H1N2 SDRPV-1 : Finistère	0, 1 et 6h	MOI = 3	NTP _r	Lorsqu'il est inoculé simultanément ou peu de temps avant le swIAV, le SDRPV est capable d'inhiber l'infection par le H1N2, de moduler la réponse interféron, de modifier la phosphorylation des protéines de signalisation (ERK, AKT, AMPK et JAK2) et d'inhiber l'expression de RIG-I, IFN-I, Mx1 et Mx2.	(Saade et al., 2020b)

IN: intranasale, IM: intramusculaire; EOPS : Exempt d'organismes pathogènes spécifiés ; IT: intratrachéale; PFU: plaque-forming units ; TCID₅₀: 50% Tissue Culture Infectious Dose. MLV : Modified Live Virus Vaccines



OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Les pathologies respiratoires sont très répandues dans les élevages de porcs. Au-delà de leur impact sur le bien-être des animaux, elles engendrent de lourdes pertes financières en raison de la baisse des performances zootechniques et du coût des intrants médicamenteux. Ces troubles, rassemblés sous la dénomination de complexe respiratoire porcin (CRP), résultent bien souvent de situations complexes impliquant plusieurs agents pathogènes, virus (SDRPV ou swIAV, etc.) ou bactéries (Mhp, etc.) (Opriessnig et al., 2011).

Les études des mono-infections SDRPV, swIAV ou Mhp, menées notamment au Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort sur des porcelets EOPS, ont montré que l'altération de l'épithélium du tractus respiratoire et du système immunitaire de l'hôte peuvent être des éléments clés du CRP (Deblanc et al., 2016; Deblanc et al., 2012; Renson et al., 2017). Cependant, le CRP est d'intensité variable, et même si des facteurs environnementaux et des facteurs dépendant de l'hôte jouent certainement un rôle dans la sévérité de la maladie, il est émis l'hypothèse que celle-ci dépend étroitement des interactions entre les agents pathogènes eux-mêmes. Des enquêtes épidémiologiques menées par le laboratoire dans des élevages naisseur-engraisseur de l'Ouest de la France ont montré que Mhp et le swIAV de sous-type H1_{av}N1 participent tous deux significativement au développement des lésions de pneumonie observées à l'abattoir (Fablet et al., 2012a). Le swIAV de sous-type H1_{hu}N2 (et non H1_{av}N1) pourrait, quant à lui, être davantage associé aux infections par le SDRPV puisqu'il a été relevé une association significative entre la présence d'anticorps anti-H1_{hu}N2 et la présence d'anticorps anti-SDRPV) (Fablet et al., 2016a). Cependant, les interactions entre ces pathogènes sont encore largement incomprises. Or mieux connaître ces interactions et les mécanismes sous-jacents permettrait de mieux comprendre le fonctionnement du CRP.

Par ailleurs, les virus grippaux sont fréquemment isolés au stade du post-sevrage, parfois chez des animaux sans syndrome grippal évident, à un stade où les porcelets sont vaccinés vis-à-vis du SDRPV à l'aide de MLV. Il pourrait donc y avoir un risque, en élevage, que l'infection grippale puisse interférer avec la prise vaccinale anti-SDRPV, car l'infection à swIAV est connue pour induire une forte réponse antivirale à IFN- α (Crisci et al., 2019), or la sécrétion d'IFN- α peut aussi affecter l'efficacité d'un MLV (Brockmeier et al., 2017).

Dans ce contexte, les travaux menés au cours de cette thèse ont eu pour objectifs d'étudier les interactions entre deux pathogènes majeurs du CRP, le SDRPV et le swIAV, afin de comprendre les effets cumulés de ces deux infections fréquemment rencontrées sur le territoire français, ceci pour mieux les appréhender, non pas individuellement, mais

collectivement, et d'évaluer le risque d'interférence entre l'infection swIAV et la vaccination anti-SDRPV.

Trois sous-objectifs ont ainsi été distingués :

1. Evaluer l'impact d'une infection par le SDRPV sur une infection subséquente par le swIAV
2. Evaluer l'impact d'une infection swIAV sur le devenir d'une infection SDRPV en cours
3. Evaluer l'impact d'une infection grippale sur la vaccination anti-SDRPV effectuée à l'aide d'un MLV

Afin de répondre à ces trois objectifs, trois études différentes ont été mises en place.

1. Etude virologique et immunologique de la co-infection SDRPV/swIAV chez les porcs inoculés en conditions expérimentales

Afin de répondre aux deux premiers sous-objectifs du projet, un essai expérimental a été mené en collaboration avec le Service de Production de Porcs Assainis et d'Expérimentation (SPPAE) de l'ANSES de Ploufragan-Plouzané-Niort, site de Ploufragan.

Des porcs EOPS ont successivement été inoculés par un SDRPV-1, puis par un swIAV H1_{hu}N2, à une semaine d'intervalle. Les paramètres cliniques, virologiques et immunologiques de l'infection à swIAV d'une part et de l'infection à SDRPV d'autre part, ont été suivis au niveau systémique mais également au niveau pulmonaire chez les animaux inoculés séquentiellement. Les réponses aux infections dans le contexte des inoculations successives ont été comparées aux réponses observées suite à des mono-infections.

Les résultats de cet essai expérimental sont présentés dans le chapitre 1.

2. Etude de la co-infection SDRPV/swIAV dans un modèle de co-culture de macrophages alvéolaires et de cellules épithéliales de trachée

L'expérimentation *in vivo* sur porcs EOPS permet d'étudier l'impact de la co-infection SDRPV/swIAV dans un organisme entier, mais des limites existent. En effet, la limitation du nombre de porcs, l'impossibilité d'effectuer des cinétiques de prélèvements rapprochés ou la quantité restreinte d'échantillons prélevés sont des facteurs limitant l'analyse détaillée des mécanismes sous-jacents aux interactions entre les deux virus. Le développement de méthodes alternatives *in vitro* permet ainsi de compléter les résultats obtenus *in vivo*. Dans le

cadre de ce projet de thèse, un modèle de co-culture utilisant les cellules cibles des deux virus étudiés, soit les PAM pour le SDRPV et les cellules épithéliales de trachée de porc (NPTr) pour les swIAV a été mis au point. Les objectifs de cette étude *in vitro* étaient d'analyser l'impact de la co-infection SDRPV/swIAV sur les multiplications virales et la réponse antivirale IFN-I.

Les résultats de cette étude *in vitro* sont présentés dans le chapitre 2.

3. Impact d'une infection concomitante par un swIAV sur la vaccination des porcelets contre le SDRP à l'aide d'un vaccin vivant atténué

Une seconde étude *in vivo* a été menée afin d'évaluer, chez le porcelet, l'impact d'une infection par un swIAV sur i) la réplication d'un MLV anti-SDRPV, ii) la réponse immunitaire post-vaccinale et sur iii) l'efficacité de la vaccination anti-SDRPV vis-à-vis d'une épreuve virulente.

Les résultats de cet essai expérimental sont présentés dans le chapitre 3.



RESULTATS

CHAPITRE 1

Etude virologique et immunologique de la co-infection SDRPV/swIAV chez les porcs inoculés en conditions expérimentales

Introduction

Le SDRPV et les swIAV sont les principaux agents viraux du CRP et le risque de co-infection au sein d'un élevage porcin est important (Fablet et al., 2012a; Fablet et al., 2011). Les précédentes études de co-infections se sont principalement concentrées sur les paramètres cliniques et virologiques et leurs résultats ont mis en évidence soit la présence d'exacerbations de lésions pulmonaires chez des animaux co-infectés SDRPV/swIAV (Kitikoon et al., 2009; Van Reeth et al., 1996, 2001) soit aucune différence au niveau des signes cliniques entre les groupes mono-infectés et co-infectés (Pol et al., 1997; Pomorska-Mol et al., 2020). De plus, les études des réponses immunitaires de l'hôte au cours de cette co-infection SDRPV/swIAV n'ont été que peu abordées, tant au niveau systémique qu'au niveau pulmonaire.

Compte tenu des durées respectives des infections SDRPV (longue et persistante) et swIAV (courte), il est plus probable que le porc soit d'abord infecté par le SDRPV puis par le swIAV, plutôt que l'inverse. Afin de comprendre les effets cumulés de ces deux infections au niveau virologique et immunologique, nous avons donc entrepris d'évaluer, à l'aide d'un modèle expérimental de co-infection SDRPV/swIAV chez le porc (i) l'effet d'une infection à SDRPV sur une infection subséquente par le swIAV et (ii) l'effet d'une infection à swIAV sur le devenir d'une infection SDRPV en cours.

Protocole expérimental et analyses

Vingt-quatre porcelets EOPS de 8 semaines d'âge ont été répartis en quatre groupes de six animaux chacun :

- Un groupe inoculé par le SDRPV-1 (souche Finistère, 5×10^5 TCID₅₀, voie nasale) au jour (J) 0 (groupe SDRPV)
- Un groupe inoculé par le swIAV (H1_{hu}N2, souche A/Sw/Ile et Vilaine/0415/2011, 10^6 TCID₅₀, voie trachéale) à J8 (groupe swIAV)
- Un groupe co-inoculé par le SDRPV à J0 puis par le swIAV à J8 (groupe SDRPV/swIAV)
- Un groupe inoculé par du milieu de culture MEM à J0 et J8 (groupe Contrôle).

L'intervalle de temps entre les deux inoculations virales, soit 8 jours, correspond au moment où le poumon des porcs EOPS semble être potentiellement le plus déstabilisé suite à l'infection par le SDRPV et donc possiblement, le plus sensible aux surinfections (Renson et al., 2017).

La température rectale, les signes respiratoires (toux, éternuements, fréquence respiratoire) et le score clinique ont été mesurés quotidiennement. Des prélèvements de sang (sang total sur EDTA, sérum et sang sur héparine pour en isoler les PBMC) ainsi que des lavages broncho-alvéolaires (BAL) ont été effectués à J-2, J7, J9, J12, J15, J21 et J26. Des écouvillons nasaux ont été réalisés tous les jours à partir de J9, puis une fois par semaine pour les groupes SDRPV/swIAV et swIAV. Pour le groupe SDRPV, des écouvillons nasaux ont été effectués aux mêmes points de cinétique que les prélèvements de sang et de BAL. Les animaux ont été euthanasiés entre J27 et J29. Les charges génomiques du SDRPV-1 et du swIAV (H1_{nu}N2) ont été mesurées par RT-qPCR (ORF5 et gène M, respectivement). Les niveaux d'IFN- α , d'IL-6, d'IL-4 et d'IL-10 ont été mesurés sur les matrices sérum et/ou surnageants de BAL par ELISA. Un dosage d'haptoglobine a été effectué à partir des échantillons de sérum. La dynamique de population des cellules de l'immunité innée (macrophages et granulocytes) a été mesurée par cytométrie en flux sur les cellules de BAL. Les anticorps (IgG, IgA, anti-HA, neutralisants) dirigés contre le SDRPV-1 et/ou le swIAV ont été mesurés sur les surnageants de BAL et/ou le sérum. La réponse immunitaire à médiation cellulaire spécifique du SDRPV-1 et du swIAV a été analysée par ELISPOT IFN- γ sur des PBMC. Pour finir, des analyses de corrélations, à travers des analyses en composantes principales (ACP), ont été effectuées à l'aide de l'ensemble des variables obtenues au cours de cet essai.




Publication n°1

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'un article publié en 2021 dans la revue *Viruses* et intitulé « **Successive inoculations of pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 (PRRSV-1) and swine H1N2 influenza virus suggest a mutual interference between the two viral infections** ».

La doctorante a participé à la préparation du protocole de l'essai, a géré les réceptions des prélèvements au laboratoire, a participé aux autopsies, a mis en œuvre l'ensemble des analyses de laboratoire, a réalisé les analyses statistiques, a interprété les résultats, a préparé les figures et a rédigé le draft de l'article.

Article

Successive Inoculations of Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 (PRRSV-1) and Swine H1N2 Influenza Virus Suggest a Mutual Interference between the Two Viral Infections

Juliette Bougon^{1,2}, Céline Deblanc^{1,†}, Patricia Renson^{1,†}, Stéphane Quéguiner¹, Stéphane Gorin¹, Sophie Mahé¹, Mireille Le Dimna¹, Nicolas Barbier¹, Frédéric Paboeuf³, Gaëlle Simon^{1,*},
and Olivier Bourry^{1,†}

- ¹ French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES), Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Swine Virology Immunology Unit, BP53, 22440 Ploufragan, France; juliette.bougon@anses.fr (J.B.); celine.deblanc@anses.fr (C.D.); patricia.renson@anses.fr (P.R.); stephane.queguiner@anses.fr (S.Q.); stephane.gorin@anses.fr (S.G.); sophie.mahe@anses.fr (S.M.); mireille.ledimna@anses.fr (M.L.D.); nicolas.barbier@anses.fr (N.B.); olivier.bourry@anses.fr (O.B.)
- ² University of Rennes 1, Cité Internationale, 1 Place Paul Ricoeur, CS 54417, 35044 Rennes, France
- ³ ANSES, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, SPF Pig Production and Experimentation Unit, BP53, 22440 Ploufragan, France; frederic.paboeuf@anses.fr
- * Correspondence: gaelle.simon@anses.fr; Tel.: +33-296-010-163
- † These authors contributed equally to this work.
- ‡ These authors contributed equally to this work.



Citation: Bougon, J.; Deblanc, C.; Renson, P.; Quéguiner, S.; Gorin, S.; Mahé, S.; Le Dimna, M.; Barbier, N.; Paboeuf, F.; Simon, G.; et al. Successive Inoculations of Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 (PRRSV-1) and Swine H1N2 Influenza Virus Suggest a Mutual Interference between the Two Viral Infections. *Viruses* **2021**, *13*, 2169. <https://doi.org/10.3390/v13112169>

Academic Editor: Helle Bielefeldt-Ohmann

Received: 26 July 2021
Accepted: 26 October 2021
Published: 27 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and swine influenza A virus (swIAV) are major pathogens of the porcine respiratory disease complex, but little is known on their interaction in super-infected pigs. In this study, we investigated clinical, virological and immunological outcomes of successive infections with PRRSV-1 and H1N2 swIAV. Twenty-four specific pathogen-free piglets were distributed into four groups and inoculated either with PRRSV at study day (SD) 0, or with swIAV at SD8, or with PRRSV and swIAV one week apart at SD0 and SD8, respectively, or mock-inoculated. In PRRSV/swIAV group, the clinical signs usually observed after swIAV infection were attenuated while higher levels of anti-swIAV antibodies were measured in lungs. Concurrently, PRRSV multiplication in lungs was significantly affected by swIAV infection, whereas the cell-mediated immune response specific to PRRSV was detected earlier in blood, as compared to PRRSV group. Moreover, levels of interferon (IFN)- α measured from SD9 in the blood of super-infected pigs were lower than those measured in the swIAV group, but higher than in the PRRSV group at the same time. Correlation analyses suggested an important role of IFN- α in the two-way interference highlighted between both viral infections.

Keywords: swine influenza A virus; Betaarterivirus suid 1; porcine respiratory disease complex; virus-virus interaction; viral interference; innate and adaptive immune responses; inflammatory response; interferon; super-infection

1. Introduction

Porcine respiratory disease complex (PRDC) is a major issue for pig producers worldwide, because of economic impacts in swine herds and public health concerns due to the excretion of zoonotic pathogens and antibiotics treatments. PRDC is a multifactorial disease due to simultaneous or sequential viral and/or bacterial infections which could induce severe respiratory troubles leading to poor animal growth in the case of additive or synergic outcomes [1]. The PRDC manifestation could depend on environmental factors, breeding practices, farm management and host-dependent factors such as age, genetics or immune status. However, PRDC severity could also closely depend on the interactions

between pathogens themselves. Previous studies showed that respiratory viral infections can promote an ideal environment for bacterial super-infections through the destruction of the epithelial barrier, the over-expression of receptors involved in bacterial adhesion to the cells and the alteration of host immune system [1,2]. Conversely, a pre-existing chronic pulmonary bacterial infection, such as *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) infection, could potentiate the outcome of a subsequent viral infection by inducing production of pro-inflammatory cytokines and recruitment of immune cells [2,3]. Unfortunately, only few studies have explored the virus/virus interactions that may occur in pig respiratory tract. Among the viruses involved in PRDC, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and swine influenza A virus (swIAV) are among the most important primary agents [1]. These viruses are both highly prevalent and enzootic in pig populations from several European countries [4,5]. PRRSV is an enveloped virus with a positive-sense single-stranded RNA genome that belongs to the genus Betaarterivirus of the Arteriviridae family. There are two PRRSV species, Betaarterivirus suid 1 (PRRSV-1) and Betaarterivirus suid 2 (PRRSV-2), mostly widespread in Europe and North America/Asia, respectively [6,7]. This virus primarily infects alveolar macrophages [8], is responsible for long-lasting infections [9,10], and is considered a causative agent of reproductive troubles, respiratory disorders and growth retardation [11]. Most PRRSV strains interfere with innate antiviral immune responses by blocking interferon-alpha (IFN- α) signaling and promoting the secretion of immunosuppressive cytokines, such as interleukin-10 (IL-10) [12]. swIAV is an enveloped virus with a negative-sense, single-stranded and segmented RNA genome that belongs to the genus Influenzavirus A of the Orthomyxoviridae family [13]. There are three swIAV subtypes, i.e., H1N1, H1N2 and H3N2, which circulate simultaneously in areas of high pig density, with multiple region-specific genetic lineages within each subtype [14,15]. swIAV target cells are epithelial cells of the upper and lower respiratory tracts [13]. swIAV infection is responsible for acute respiratory disease, characterized by fever, cough, sneezing, apathy and dyspnea, associated with growth retardation [16]. Unlike PRRSV, swIAV is known to be a high inducer of type-I IFN and inflammatory responses [17]. In production areas where PRRSV and swIAV are widespread, there is a high risk that pig farms are infected by both viruses at the same time [18,19]. However, very few studies have analyzed the impact of a PRRSV/swIAV super-infection in pigs. They have mainly focused on clinical and virological parameters, but with inconsistent results; some studies have reported exacerbations of lung lesions [20–22], whereas others showed no difference in clinical signs as compared to single-infected animals [21,23,24]. Furthermore, the host immune responses have been studied only to a very limited extent at the systemic or pulmonary levels. Considering the lacks and apparent contradictions of these previous studies, new investigations were necessary to better characterize the effect one virus infection may have on the other, as well as the impact of dual PRRSV/swIAV infection on the host immune responses.

In Brittany, France, epidemiological investigations in farrow-to-finish farms showed that seropositive status towards infection with swIAV from the “European human-like reassortant swine H1N2” (H1_{hu}N2) lineage, but not the “European avian-like swine H1N1” (H1_{av}N1) lineage, was significantly associated with seropositive status towards PRRSV-1 infection [25]. In this context, we aimed, in an experimental study, (i) to investigate the clinical and immuno-virological impact of a PRRSV-1 infection on a subsequent H1_{hu}N2 swIAV infection, and (ii) to explore the effect of H1_{hu}N2 swIAV infection on the course of ongoing PRRSV-1 infection. Knowing that the impact of PRRSV-1 single-infection in lungs of specific-pathogen-free (SPF) pigs is a maximum of one week post-inoculation, with both the highest PRRSV-1 genomic load and the lowest alveolar macrophage count [10], we delayed swIAV inoculation by eight days after that of PRRSV-1. Thus, pigs were inoculated either with PRRSV at study day (SD) 0, or with swIAV at SD8, or with PRRSV and swIAV at SD0 and SD8, respectively, or mock-inoculated. Monitoring of clinical outcomes and viral multiplications, as well as studies of innate and adaptive immune responses specific

to each virus at both the systemic and pulmonary levels, were implemented for four weeks post-inoculation with PRRSV.

2. Materials and Methods

2.1. Virus Strains and Titrations

The PRRSV-1 subtype 1 Finistere strain (PRRS-FR-2005-29-24-1) (GenBank accession No. KY366411) was isolated in 2005 from a sow with reproductive failures in a herd located in Brittany, France. Infectious particles of PRRSV-1 were propagated and titrated on primary porcine alveolar macrophages (PAMs) collected from SPF piglets for three and four passages for in vivo inoculations and enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assays, respectively. Serial 10-fold dilutions of samples were performed in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 4% of penicillin–streptomycin, 10% of fetal bovine serum, 1% L-Glutamin and incubated at 37 °C, 5% CO₂. The cytopathic effects were observed after five to seven days. Virus titers were calculated using the Karber method [26].

The swIAV strain A/Sw/France/Ille et Vilaine-0415/2011 of H1_{hu}N2 subtype (GenBank accession No. KR699787-94) was isolated from a pig with acute respiratory disease during an outbreak in a pig herd located in Brittany, France. Infectious particles of swIAV were propagated and titrated on Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells for five passages. Serial 10-fold dilutions of samples were performed in minimal essential medium (MEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 2% of penicillin–streptomycin and 2 µg/mL Trypsine TPCK (Worthington, Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) and incubated at 37 °C, 5% CO₂. The cytopathic effects were observed after three to four days. Virus titers were calculated using the Reed and Muench method [27].

2.2. Animal Experiment Design

Twenty-four 8-week-old SPF piglets were used in this study. They were obtained from the air-filtrated pig herd of the French Agency for Food, Environmental, and Occupational Health and Safety (ANSES, Ploufragan, France). The piglets were randomly distributed into four groups of six animals and housed into four independent rooms (Table 1) in our biosecurity level 3 animal facilities. PRRSV-1 Finistere strain (5×10^5 TCID₅₀ in a volume of 5 mL per pig) was inoculated intranasally at SD0 to the pigs from PRRSV and PRRSV/swIAV groups. swIAV H1_{hu}N2 strain (10^6 TCID₅₀ in a volume of 5 mL per pig) was inoculated intratracheally at SD8 to the pigs from swIAV and PRRSV/swIAV groups. For mock-inoculations and the Control group, 5 mL of MEM was inoculated, intranasally at SD0 and intratracheally at SD8.

Table 1. Experimental design.

Group	PRRSV Inoculation	swIAV Inoculation	Necropsy
PRRSV	SD0	-	SD27
swIAV	-	SD8	SD29
PRRSV/swIAV	SD0	SD8	SD28
Control	-	-	SD27 and SD28

SD: Study day; -: mock-inoculation.

The experiment was performed in the ANSES facilities, which have an agreement for animal experimentation, delivered by the Direction Départementale de la Protection des Populations des Côtes d’Armor (ANSES registration number C-22-745-1). The animal experiment was authorized by the French Ministry for Research (authorization no. APAFIS#19874-2019032011429342 v3) and approved by the National Committee for Ethics in Animal Experimentation ANSES/ENVA/UPEC n°16 (approval no. 19-023#19874).

2.3. Clinical Monitoring, Sampling and Necropsy

Clinical signs (rectal temperature, cough and sneezing) were daily recorded, as previously described [28]. Hyperthermia was assigned to rectal temperature higher than 40 °C. Cough and sneezing were counted for 15 min in each room. Individual weighing and food consumption in each pen were measured weekly.

Blood samples and broncho-alveolar lavages (BAL) were collected at SD-2, 7, 9, 12, 15, 21, 26 in all groups. Serum samples were collected from coagulated blood samples (3000× *g* for 5 min centrifugation) and frozen at −20 °C for antibody measurements and cytokine analyses, and −80 °C for viral titration and RT-qPCR analyses. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood by Ficoll-density gradient centrifugation with LeucoSep tubes (Greiner Bio One, Les Ulis, France) and frozen in liquid nitrogen using dimethyl sulfoxide (DMSO)-containing cryopreservation medium (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) until analyses to monitor cellular immune responses. BAL collection was performed under general anesthesia following the intramuscular injection of 10 mg/kg Zoletil (Virbac, Carros, France) and were obtained by infusing 2 × 20 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS) using a tracheal suction probe (Vygon, Ecouen, France), where size and diameter depended on the age and weight of animals. BAL fluid (BALF) was collected after centrifugation of the BAL at 400× *g* for 8 min at 4 °C and frozen at −20 °C until antibody and cytokine analyses, and −80 °C for viral titration and RT-qPCR analyses. BAL cells (BALCs) were isolated after BAL centrifugation and frozen in the same way as PBMCs until flow cytometry analyses.

Nasal swabs were sampled daily from SD8 for one week, then once a week, in the PRRSV/swIAV and swIAV groups. In the PRRSV group, nasal swabs were only collected at the times of blood and BAL collections. Nasal swabs were suspended in Virocult (MW915 sent, Virocult®, Corsham, UK) and supernatants were frozen at −80 °C until RT-qPCR and viral titration analyses.

The pigs were euthanized using anesthesia with 10 mg/kg of Zoletil followed by bleeding and necropsied between SD27 and SD29 (Table 1). Post-mortem examination and scoring of pneumonia lesions was performed as previously described [29].

2.4. Quantifications of PRRSV and swIAV Genomic Loads

The PRRSV genome was quantified in sera, BALF and nasal swab supernatants. Viral RNA was extracted by the KingFisher™ Flex automated extraction robot (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using the Maxwell® HT 96 gDNA Blood kit (Promega, Lyon, France). Detection and quantification of PRRSV Finistere strain was assessed by duplex reverse transcription–quantitative real-time PCR (RT-qPCR) using the SuperScript III Platinum one-step RT-qPCR kit (Life Technologie, Carlsbad, CA, USA) with primers and probes specific to ORF5 and β-actin as previously described [10]. RT-qPCR was performed on a Chromo4 real-time PCR device (Biorad, Hercules, CA, USA). The RT-qPCR conditions were: 50 °C for 30 min, 94 °C for 2 min, 45 cycles each of 94 °C for 15 s and 60 °C for 30 s. Virus genome quantification was obtained by using serial dilutions of PRRSV Finistere strain with a known infectious titer in BALF or serum collected in SPF pigs. The PRRSV genome amount was expressed as equivalent TCID₅₀/mL, as previously reported [30,31].

The swIAV genome was quantified in nasal swab supernatants and BALF. swIAV RNA was extracted using the same protocol as for PRRSV RNA. Detection and quantification of the swIAV M gene was assessed by duplex M/β-actin RT-qPCR using a Go Script RT mix for 1-Step RT-qPCR (Promega, Madison, WI, USA), as previously described [32]. RT-qPCR was performed on an MX 3005P real-time PCR device (Stratagene, CA, USA). The RT-qPCR conditions were: 45 °C for 30 min, 95 °C for 2 min, 40 cycles each of 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min. Virus genome quantification was obtained by using serial dilutions of standardized M and β-actin mRNA. The swIAV genome amount was expressed as copy numbers of M gene/10⁶ copies of β-actin gene.

2.5. Haptoglobin and Cytokine Measurements

Haptoglobin concentrations in serum were measured using a Phase Haptoglobin colorimetric Assay kit (Tridelta, Maynooth, Ireland). Porcine IFN- α was quantified in serum and BALF by an in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [33]. Commercial ELISA kits were used to measure porcine IL-6 (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA), IL-4, IFN- γ and IL-10 (Invitrogen, CA, USA) in serum and/or BALF. IL-6 and IL-10 concentrations were low and close to the quantification threshold of the ELISA kits; therefore, we considered these cytokines to be induced when the optical density (OD) of the sample was higher than the basal level observed in uninfected pigs, i.e., the mean OD + 2 standard deviations calculated for the Control group.

2.6. Blood Cell Count and BALC Phenotyping

Total blood counts were performed with an MS9.5 hematology analyzer (Melet Schloesing Laboratoires, Osney, France) from EDTA blood samples.

Phenotyping of macrophages and granulocytes from BAL was performed by flow cytometry analysis on frozen BALCs. BALCs were thawed, washed in PBS ($400 \times g$ for 5 min at 4 °C), transferred to 96-well plates (0.5×10^6 cells per well) and then single- or triple-stained with the following primary mouse monoclonal antibodies for 30 min at 4 °C: R-phycoerythrin (RPE)-conjugated anti-pig CD172 α (clone 74-22-15), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-pig CD203 α (clone PM18-7), unlabeled anti-pig SWC8 (clone MIL3) (BioRad, Hercules, CA, USA and Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) or stained with appropriate mouse isotype control, RPE or FITC-coupled IgG1 (Biorad) and unlabeled mouse IgM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The unlabeled primary antibody was detected by a secondary FITC-conjugated human anti-mouse IgM antibody (Biorad). Antibodies were used at the concentrations that were recommended by the manufacturers. A 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) cell viability solution was used to exclude dead cells, according to the recommendation of the manufacturer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). For each immunostaining, data from 30,000 events were acquired with an FC500 cytometer and analyzed with Kaluza 1.2 software (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

2.7. Antibody Assessment

Anti-PRRSV (protein N) immunoglobulins G (IgG) were detected with IDEXX PRRS X3 ELISA kit (IDEXX laboratories, Liebefeld, Switzerland), in serum following the manufacturer's instructions (dilution 1:40), and in BALF using an adapted protocol (dilution 1:2). Anti-PRRSV immunoglobulins A (IgA) were detected in BALF (dilution 1:2) with the same kit as IgG with a modified protocol using goat anti-pig IgA antibody HRP conjugate (Euromedex, Souffelweyersheim, France) at a 1:3000 dilution as a conjugated antibody.

Anti-swIAV (protein NP) IgGs were detected with the ID Screen Influenza A Nucleoprotein Swine Indirect kit (Innovative Diagnostics, Grabels, France) in serum (dilution 1:100) and BALF (dilution 1:2). Anti-swIAV IgAs were detected in BALF (dilution 1:50) with the same kit using goat anti-pig IgA antibody HRP conjugate (Euromedex, Souffelweyersheim, France) at a 1:3000 dilution as a conjugated antibody.

For anti-PRRSV and anti-swIAV IgA assays in BALF, the negative and positive controls included in the commercial kits were replaced by in-house BALF controls, calibrated as those for anti-PRRSV or anti-swIAV IgG from each kit to calculate sample-to-positive (S/P) ratios.

2.8. Hemagglutination Inhibition Assay

Antibodies directed against the swIAV H1_{hu}N2 hemagglutinin (HA) were titrated in sera and BALF collected at SD21 and SD26 using the hemagglutination inhibition (HI) assay following standard procedures [34]. Briefly, RDE (*Vibrio cholerae* Receptor-Destroying Enzyme) treatment and chicken erythrocyte-adsorbed were performed on samples to eliminate non-specific HA inhibitors and non-specific agglutinins. These samples were serially

diluted two-fold from 1/10 to 1/2560. The challenge swIAV strain A/Sw/France/Ille et Vilaine-0415/2011 (H1_{hu}N2) was used as a virus antigen. Four hemagglutinating units (HAUs) of antigen were added to each well and incubated for 35 min at room temperature. A suspension of 40×10^6 chicken erythrocytes per milliliter was then added to each well, and HI titers were read after incubation for 35 min at room temperature. HI titers equal to or greater than 10 were considered to be positive.

2.9. Virus Neutralization Assays

PRRSV-specific neutralizing antibodies were detected in sera collected at SD26. Sera were heat-inactivated at 56 °C for 30 min. Then, they were serially diluted two-fold from 1/5 to 1/320 and 50 µL samples of each dilution were incubated in duplicate in 96-well microtiter plates with the PRRSV DV strain (GenBank accession No. MW674756), a PRRSV-1 reference strain close to the Finistere strain, at $10^{1 \pm 0.5}$ TCID₅₀/50 µL for 1 h at 37 °C, 5% CO₂, with rocking agitation. A suspension of Meat Animal Research Center-145 (MARC-145) cells (0.5×10^5 per well) was then added to each well, and after incubation for five to seven days at 37 °C, 5% CO₂, the titers were determined as the reciprocal of the highest dilution of serum that prevents virus infection of the cell monolayer, as determined by the absence of cytopathic effect in half of the duplicate wells. The titers were log₂-transformed in order to calculate the mean neutralizing titer of each group.

swIAV-specific neutralizing antibodies were titrated in sera and BALF collected at SD21 and SD26. Sera and BALF were previously RDE-treated and chicken erythrocytes-adsorbed to reduce non-specific reactions, as described above. Then, they were serially diluted two-fold from 1/20 to 1/20,480 and 50 µL samples of each dilution were incubated in duplicate in 96-well microtiter plates with the swIAV strain A/Sw/France/Ille et Vilaine-0415/2011 (H1_{hu}N2) used as a virus antigen, at $10^{1.5}$ TCID₅₀/50 µL for 1 h at 37 °C, 5% CO₂, with rocking agitation. Then, the virus/sample mixtures were inoculated into adherent MDCK cells (3×10^4 cells per well) for 1.5 h at 37 °C, 5% CO₂ with rocking agitation. After two washings, samples were incubated with 100 µL of MEM supplemented with 2% of penicillin–streptomycin and 2 µg/mL trypsin TPCK for three to four days at 37 °C, 5% CO₂. The titers were determined using the same method as for PRRSV-specific neutralizing antibodies.

2.10. Quantification of IFN-γ-Secreting Cells

PRRSV and swIAV-specific IFN-γ-secreting cells (IFN-γ-SCs) were quantified by ELISPOT using a protocol adapted to frozen PBMC. ELISPOT assays were performed in triplicate. Millipore MultiScreen 96-well plates (Millipore, Burlington, MA, USA) were coated with 0.5 µg/well of purified mouse anti-pig IFN-γ antibody (clone P2G10, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) overnight at 4 °C. For each stimulation, 4×10^5 PBMCs were incubated at 37 °C, 5% CO₂ during 42 h at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 for PRRSV-1 Finistere strain and an MOI of 1 for swIAV strain A/Sw/France/Ille et Vilaine-0415/2011 (H1_{hu}N2). Positive control was performed by stimulating PBMCs with 10 µg/mL of phytohemagglutinin (Eurobio, Courtaboeuf, France), and negative control by stimulating PBMCs with MEM. IFN-γ was detected by adding 50 µL/well of biotinylated mouse anti-pig IFN-γ antibody (clone P2C11, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) at 0.5 µg/mL for two hours and then 50 µL/well of streptavidin alkaline phosphatase (1:1000 dilution, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for one hour at room temperature. The number of spots representing specific IFN-γ-SCs were revealed by the alkaline phosphatase conjugate substrate kit (BioRad, Hercules, CA, USA). The number of spots per well was counted with an ImmunoSpot S6 UV Analyzer (CTL, Shaker Heights, OH, USA). The number of IFN-γ-SCs was obtained by subtracting the number of non-specific spots from negative control to the number of spots obtained with PRRSV or swIAV stimulations. The results are expressed as the number of IFN-γ-SCs per 10⁶ PBMC.

2.11. Statistical Analysis

Data were analyzed by using non-parametric Kruskal–Wallis test with Holm’s corrected pairwise comparisons to study difference between groups. For haptoglobin measurement, a Holm’s adjusted pairwise Wilcoxon–Mann–Whitney test using paired parameters was used to assess differences between time points within each group. Principal component analyses (PCAs) were performed with 13 variables (Figure S1) when analyzing PRRSV/swIAV and PRRSV groups, and 20 variables (Figure S2) when analyzing PRRSV/swIAV and swIAV groups. All variables studied were listed according to the SD and sample matrix (Table 2). PCA graphics were produced using the FactoMineR R packages and the correlation analysis was performed with a bilateral Spearman’s non-parametric test. Correlation analyses between all variables were also performed using the Spearman rank correlation test (Figures S1 and S2). All the statistical analyses were performed using R software (version 3.1.3), and significant differences were considered when $p < 0.05$.

Table 2. List of variables included in principal component analyses.

Variables	Study Day	Sample
Rectal temperature	SD9	-
Haptoglobin	SD12	Serum
PRRSV genomic load	SD12	Serum and BALF
swIAV genomic load	SD9	BALF
Duration of swIAV nasal excretion	From SD9 to SD26	Nasal swab supernatants
IFN- α	SD9 and SD12	Serum and BALF
Neutrophils	SD9 and SD12	Blood
Granulocytes	SD9 and SD12	BALC
Macrophages	SD12	BALC
Lymphocytes	SD9	Blood
PRRSV-specific humoral response: anti-IgG, anti-IgA	SD21	Serum and BALF
swIAV-specific humoral response: anti-IgG, anti-IgA, anti-HA and neutralizing antibodies	SD21	Serum and BALF
PRRSV specific IFN- γ -SC	SD15 and SD26	Blood
swIAV specific IFN- γ -SC	SD26	Blood

3. Results

3.1. PRRSV Pre-Infection Mitigated the Clinical Impact of swIAV Infection

In order to compare the clinical outcomes of PRRSV/swIAV super-infection to that of PRRSV or swIAV single infections, rectal temperature and respiratory signs (cough, sneezing and breathing frequency) were followed-up daily from SD0. Animals from PRRSV and PRRSV/swIAV groups showed hyperthermia (rectal temperature $> 40^\circ\text{C}$) at SD1, with mean rectal temperatures of $40.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$ and $40.3 \pm 0.7^\circ\text{C}$, respectively, that were both significantly higher than in Control and swIAV groups (p -value (p) < 0.0001) (Figure 1a). The day after swIAV inoculation (SD9), all (6/6) animals in the swIAV group exhibited hyperthermia, but only 4/6 did in the PRRSV/swIAV group, resulting in a significant difference in mean rectal temperatures between both groups ($40.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$ and $39.8 \pm 1.0^\circ\text{C}$, respectively, $p = 0.0025$). At SD13, the PRRSV/swIAV group further displayed a slight increase in mean rectal temperature, significantly higher than in the Control group ($p = 0.0008$), but under the hyperthermia threshold. No or only minor respiratory troubles were observed in the PRRSV group in the time course of the experiment (Figure 1b). Cough and sneezing were recorded in the swIAV group during the first week after swIAV inoculation, at SD9–11 and SD13–14. Moreover, 6/6 pigs exhibited rapid breathing at SD9 and 2/6 pigs at SD14. In comparison, cough and sneezing were not detected in the PRRSV/swIAV group, and only 1/6 and 2/6 pigs exhibited rapid breathing at SD9 and SD14, respectively.

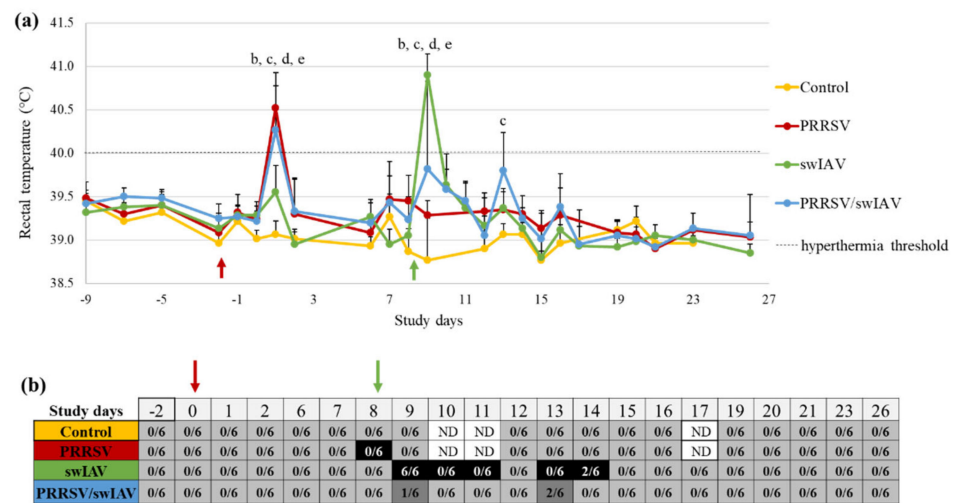


Figure 1. Clinical signs. (a) Rectal temperature. All data are reported as the mean (\pm standard deviation) of results obtained from pigs ($n = 6$) in the PRRSV/swIAV (blue), PRRSV (red), swIAV (green) or Control (yellow) groups. Study days: SD. SD0 (red arrow): PRRSV inoculation; SD8 (green arrow): swIAV inoculation. (b) Respiratory signs. $n/6$: number of pigs with rapid breathing out of the number of pigs in the group. Black box: detection of cough, sneezing in the group and rapid breathing occasionally; Dark grey box: detection of rapid breathing only; Light grey box: no respiratory signs; ND: no data; Letters indicate that significant differences (with $p < 0.05$) were obtained between PRRSV/swIAV and (a) PRRSV or (b) swIAV or (c) Control groups, (d) and (e) significant difference between PRRSV or swIAV and Control groups (respectively). Only significant differences for groups exhibiting hyperthermia are shown in this figure.

There was no difference observed between the groups in terms of growth performance, based on weighing and food consumption measurements once a week. At necropsy, three weeks after swIAV inoculation, no macroscopic lung lesions were observed in any group. Altogether, these results indicated that PRRSV pre-infection did not exacerbate, and even led to an attenuation of the influenza syndrome as usually observed after intratracheal swIAV inoculation in SPF pigs.

3.2. swIAV Infection Markedly Disrupted Ongoing PRRSV Multiplication in Lungs

PRRSV and swIAV multiplications were monitored in BALF, nasal swab supernatants and/or serum samples from all infected groups by RT-qPCR and virus titrations. No PRRSV or swIAV genome was detected in BALF or nasal swab supernatants sampled in the Control group. Additionally, the PRRSV genome was not detected in the blood of Control animals.

The PRRSV genome was detected intermittently in nasal swab supernatants from PRRSV/swIAV and PRRSV groups without significant differences between both groups. Moreover, similar PRRSV genomic loads were quantified in sera from both PRRSV and PRRSV/swIAV groups throughout the experiment (Figure 2a). However, PRRSV genomic load was markedly affected in BALF from PRRSV/swIAV group from SD9 to SD15, with a sharp decrease at SD12, as compared to the PRRSV group (Figure 2b). Then, similar genomic loads were measured in BALF from both groups from SD21. Consistently, PRRSV infectious titers measured from SD9 to SD15 in BALF from the PRRSV/swIAV group were significantly lower than those measured in the PRRSV group at the same times (Table 3). At SD12, PRRSV infectious particles could not be detected in any samples from the PRRSV/swIAV group, whereas a PRRSV titer could be determined in 5/6 pigs from PRRSV group.

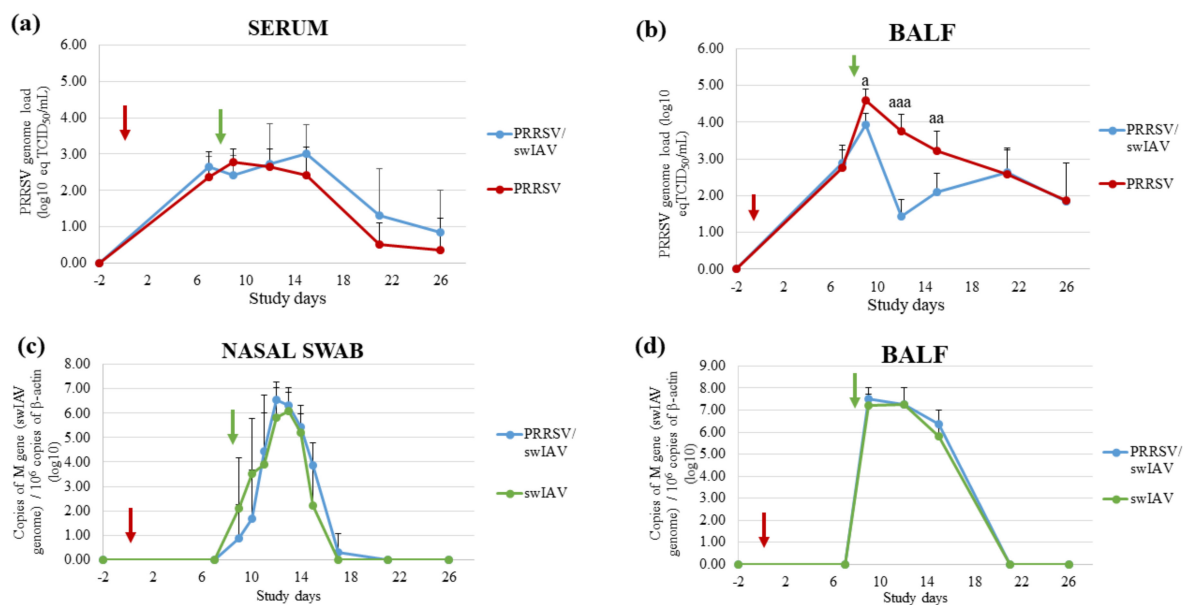


Figure 2. PRRSV or swIAV genomic load in sera, BALF and nasal swab supernatants from inoculated groups. PRRSV genomic loads quantified in sera (a) and BALF (b). swIAV genomic loads quantified in nasal swab supernatants (c) and BALF (d). All data are reported as the mean (\pm standard deviation) of results obtained from pigs ($n = 6$) in the PRRSV/swIAV group (blue), PRRSV group (red), swIAV group (green). a: $p < 0.05$; aa: $p < 0.01$; aaa: $p < 0.001$. SD0 (red arrow): PRRSV inoculation; SD8 (green arrow): swIAV inoculation.

Table 3. Mean PRRSV infectious titers (\log_{10} TCID₅₀/mL) (\pm standard deviation) measured from SD7 to SD21 in BALF from PRRSV/swIAV and PRRSV groups.

Group	SD7	SD9	SD12	SD15	SD21
PRRSV/swIAV	2.87 \pm 0.87 (6/6)	3.47 \pm 0.48 *	0 *	2.90 \pm 0.45 *	1.70 \pm 1.43 (4/6)
PRRSV	2.26 \pm 1.27 (5/6)	4.50 \pm 0.47 (6/6)	2.20 \pm 1.15 (5/6)	3.50 \pm 0.47 (6/6)	0.33 \pm 0.82 (1/6)

TCID₅₀/mL: 50% tissue culture infectious dose per milliliter; SD: study day; ($n/6$): number of pigs with infectious particles titrated. Zero has been assigned when PRRSV infectious particles could not be titrated in samples. * Significantly different from the PRRSV group.

A slight delay in swIAV excretion was observed in nasal secretions from the PRRSV/swIAV group as compared to the swIAV group (Figure 2c). Indeed, only 2/6 and 3/6 pigs were found to excrete swIAV in the PRRSV/swIAV group at SD9 and SD10, respectively, compared with 4/6 and 5/6 in the swIAV group at these dates, respectively. At SD9, swIAV titration enabled detecting swIAV infectious particles in secretions from 2/6 pigs in the swIAV group, but not in samples from the PRRSV/swIAV group. However, from SD11, all swIAV-infected pigs excreted similar virus amounts. Moreover, in contrast to what was observed for PRRSV, similar swIAV genome loads were detected in BALF from both swIAV and PRRSV/swIAV groups from SD9 to SD15 (Figure 2d). Moreover, swIAV titers were equivalent in these samples.

Thus, virological monitoring indicated that PRRSV replication in lungs was strongly disrupted following swIAV super-infection, whereas swIAV nasal shedding was only slightly delayed in PRRSV pre-infected pigs.

3.3. PRRSV Pre-Infection Attenuated Antiviral and Inflammatory Responses Induced by swIAV

Innate immune responses, i.e., antiviral (IFN- α), pro-inflammatory (IL-6), inflammatory (haptoglobin) and anti-inflammatory (IL-10) responses, were investigated in sera and/or BALF sampled during the time course of the study, and compared in the context of PRRSV and swIAV single infections versus the super-infection.

IFN- α was detected as soon as SD9 in serum and BALF from swIAV and PRRSV/swIAV groups (Figure 3a,b). However, at SD9, the serum concentration of IFN- α was markedly lower in the PRRSV/swIAV group, as compared to the swIAV group ($p = 0.0005$) (Figure 3a). In contrast, the mean IFN- α concentration in serum was significantly higher in the PRRSV/swIAV group than in the PRRSV group ($p = 0.0003$). In BALF, the IFN- α concentration increased from SD9 to SD12 for both the PRRSV/swIAV and swIAV groups, without significant differences ($p > 0.05$) (Figure 3b). However, as in serum, the IFN- α concentration in BALF was significantly higher in the PRRSV/swIAV group than in the PRRSV group ($p = 0.0419$ at SD9 and $p = 0.0036$ at SD12).

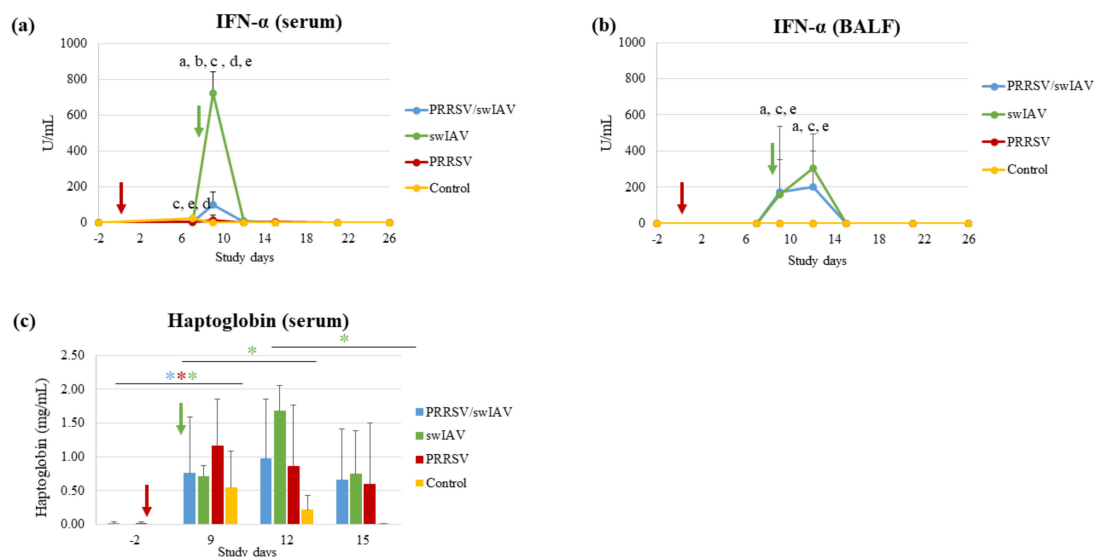


Figure 3. Quantification of IFN- α and haptoglobin. (a) Concentration of IFN- α in serum. (b) Concentration of IFN- α in BALF. (c) Concentration of haptoglobin in serum. All data are reported as the mean (\pm standard deviation) of results obtained from pigs ($n = 6$) in the PRRSV/swIAV (blue), PRRSV (red), swIAV (green) or Control (yellow) groups. Letters indicate that significant differences (with $p < 0.05$) were obtained between PRRSV/swIAV and (a) PRRSV and (b) swIAV and (c) Control groups, (d) and (e) significant difference between PRRSV and swIAV and Control groups (respectively).*: $p < 0.05$ comparing one time point to another within one group, * PRRSV/swIAV; * swIAV; * PRRSV. SD0 (red arrow): PRRSV inoculation; SD8 (green arrow): swIAV inoculation.

IL6 concentrations in sera and BALF from infected pigs were not quantifiable taking into account the limit of quantification given by the commercial kits. Nevertheless, by comparing IL-6 data in infected groups to the baseline level observed for the Control group, IL-6 induction was detected in sera from 4/6 pigs in the PRRSV/swIAV group and 6/6 pigs in the swIAV group at SD9. In BALF, IL-6 was detected in 3/6 and 5/6 pigs at SD9 and SD12, respectively, in each of the PRRSV/swIAV and swIAV groups, but not in the PRRSV group.

A significant increase in haptoglobin concentration in blood was observed from SD-2 to SD9 in all infected groups unlike in Control pigs ($p = 0.0312$ for the three groups between the two time points using paired comparisons) (Figure 3c). However, whereas a significant increase was also observed in the swIAV group from SD9 to SD12 ($p = 0.0312$), haptoglobin concentration remained as stable in the PRRSV/swIAV group as in the PRRSV group between these two time points.

As for IL-6, IL-10 induction was analyzed qualitatively comparing to the baseline level of the Control group. Between SD9 and SD15, a slight induction of this anti-inflammatory cytokine was transiently detected in the BALF from 4/6 pigs in the PRRSV/swIAV group, 2/6 pigs in the swIAV group and 1/6 in the PRRSV group.

Thus, altogether, these results indicate that antiviral (IFN- α) and inflammatory (haptoglobin) responses were reduced in the PRRSV/swIAV group, as compared to the swIAV group.

3.4. PRRSV Pre-Infection Limited Granulocyte Influx in Blood and Lungs after swIAV Infection

Investigations were then extended to the effect the PRRSV/swIAV super-infection had on the dynamics of immune cells such as lymphocytes, macrophages and granulocytes in blood and lungs.

A drop in the percentage of blood lymphocytes was observed at SD9 in the swIAV group, as compared to the three other groups ($p = 0.0006$) (Figure 4a). At SD12, the proportion of lymphocytes stabilized in the swIAV group reached the same level as in other groups. In parallel, the percentage of blood neutrophil granulocytes increased in the swIAV group at SD9, reaching a proportion that was significantly higher than that evaluated in the PRRSV/swIAV group ($p = 0.0013$) (Figure 4b).

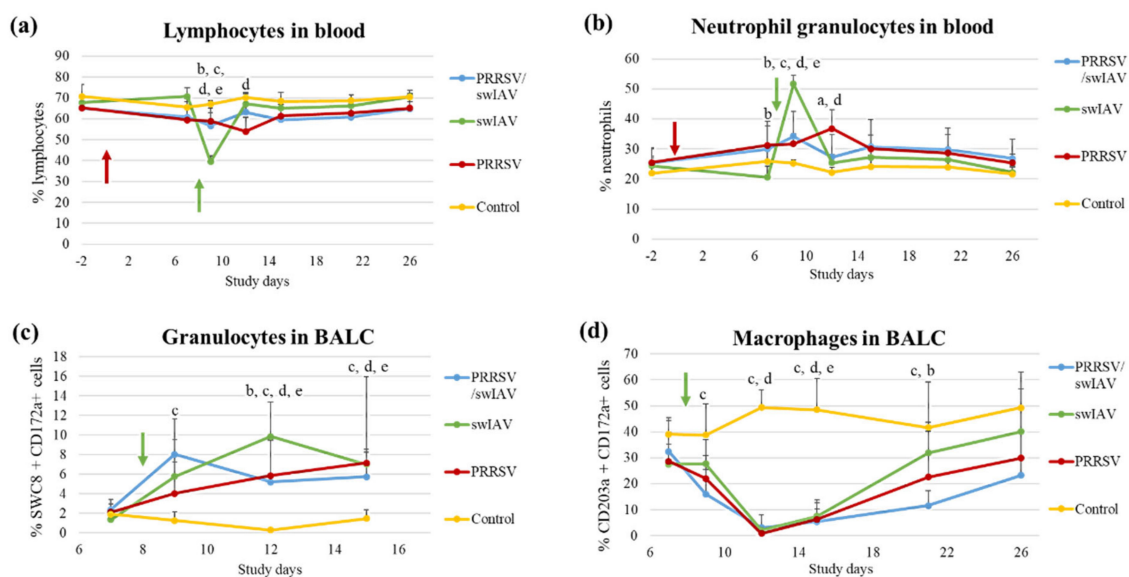


Figure 4. Immune cell proportions (percentages) in blood and among BALCs. (a) Blood lymphocytes. (b) Blood neutrophil granulocytes. (c) Granulocytes in BALC. (d) Macrophages in BALC. Data are reported as the mean (\pm standard deviation) percentages obtained from pigs ($n = 6$) in the PRRSV/swIAV (blue), PRRSV (red), swIAV (green) and Control (yellow) groups. Letters indicate that significant differences (with $p < 0.05$) were obtained between PRRSV/swIAV and (a) PRRSV and (b) swIAV and (c) Control groups, (d) and (e) significant difference between PRRSV and swIAV and Control groups (respectively). SD0 (red arrow): PRRSV inoculation; SD8 (green arrow): swIAV inoculation.

At the lung level, the influx of granulocytes within BALCs at SD12 was significantly higher in the swIAV group than in the PRRSV/swIAV group ($p = 0.0475$) (Figure 4c). In the meantime, a strong decrease in the proportions of collected lung macrophages was observed in the three infected groups as compared to the Control group (Figure 4d). However, the recovery in this cell population from SD15 was slower in the PRRSV/swIAV group, leading to significantly lower macrophage percentages at SD21 as compared to the swIAV group ($p = 0.0333$).

Thus, these findings mainly revealed that the influx of granulocytes was limited at systemic and pulmonary levels in the PRRSV/swIAV group, as compared to the swIAV group.

3.5. PRRSV Pre-Infection Enhanced the Anti-swIAV Humoral Immune Response in Lungs

Humoral immune responses to PRRSV and swIAV infections were evaluated through the detection of antibodies specific to each virus.

No difference in anti-PRRSV IgG antibody levels was observed in sera from PRRSV and PRRSV/swIAV groups in the time course of the experiment (Figure S3a). Similarly, no

differences in anti-PRRSV IgG and IgA antibody levels were observed in BALF obtained from PRRSV and PRRSV/swIAV groups (Figure S3b,c). Moreover, no PRRSV-specific neutralizing antibodies were detected in sera from PRRSV and PRRSV/swIAV groups at SD26.

Levels in anti-swIAV IgG, anti-hemagglutinin and swIAV-specific neutralizing antibodies were similar in sera from swIAV and PRRSV/swIAV groups at all collection times (Figure S4). In contrast, anti-swIAV IgG and IgA levels were significantly higher in BALF obtained at SD21 in the PRRSV/swIAV group as compared to the swIAV group ($p = 0.0032$ for anti-swIAV IgG, and $p = 0.0289$ for anti-swIAV IgA) (Figure 5a,b). In addition, the mean hemagglutination inhibition titer was higher in the PRRSV/swIAV group than in the swIAV group at SD21 ($p = 0.0011$) and SD26 ($p = 0.0329$). Consistently, mean titers in swIAV-neutralizing antibodies were higher in the PRRSV/swIAV group than in the swIAV group at SD21 ($p < 0.0001$) (Figure 5c,d).

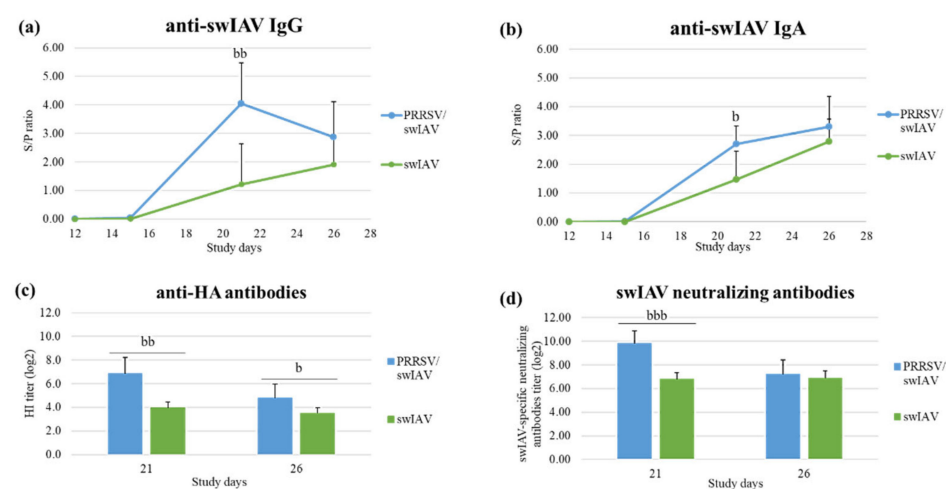


Figure 5. Anti-swIAV antibodies in BALF from infected groups. (a) IgG and (b) IgA (NP protein) levels. (c) Anti-HA antibody and (d) swIAV-neutralizing antibody titers. Data are reported as means (\pm standard deviation) of results obtained from pigs ($n = 6$) in the PRRSV/swIAV (blue) and swIAV (green) groups. b: $p < 0.05$; bb: $p < 0.01$; bbb: $p < 0.001$. SD0: PRRSV inoculation; SD8: swIAV inoculation.

IL-4 might be a marker of the stimulation of the humoral response; therefore, we also attempted to measure the IL-4 concentration in BALF, but IL-4 was not detected in the available samples. Altogether, these analyses demonstrated a stronger humoral response against swIAV in the lungs of pigs from the PRRSV/swIAV group as compared to the swIAV group.

3.6. The Cell-Mediated Immune Response Specific to PRRSV was Induced Faster in Super-Infected Pigs

The cell-mediated immune (CMI) responses specific to each virus were evaluated using ELISPOT IFN- γ assays on PBMC.

The follow-up of the PRRSV-specific immunity indicated a fast induction of the CMI response in the PRRSV/swIAV group, with a mean number of IFN- γ -secreting cells (IFN- γ -SC) significantly higher than that measured in the Control group at SD9 ($p = 0.0452$) (Figure 6a). Conversely, no difference was observed between PRRSV and Control groups at that time. Moreover, 3/6 pigs from the PRRSV/swIAV group showed a strong PRRSV-specific CMI response at SD15, with a number of IFN- γ -SC higher than 250 per million of PBMCs. In contrast, none of the pigs from the PRRSV group exceeded 200 IFN- γ -SC/ 10^6 PBMCs at the same time point. Then, at SD21 and SD26, both PRRSV/swIAV and PRRSV groups exhibited significantly higher CMI responses than the Control group.

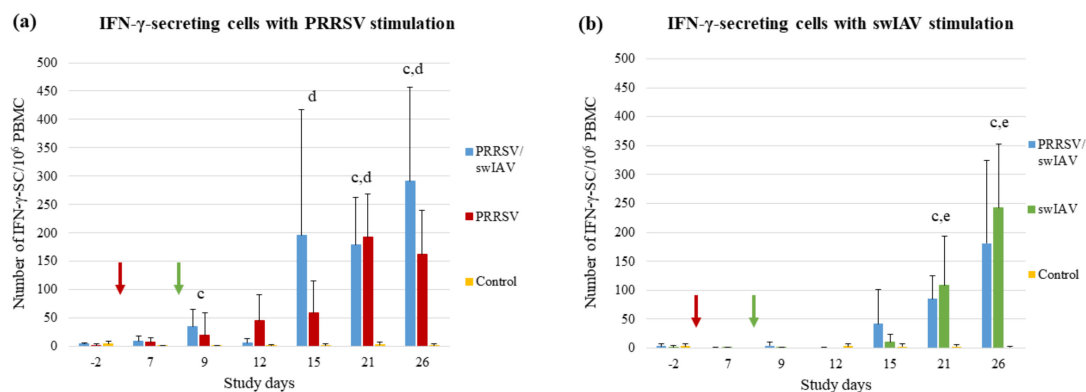


Figure 6. Cell-mediated immune response. Number of IFN- γ -secreting cells per million PBMCs after (a) PRRSV stimulation, or (b) swIAV stimulation. Data are reported as the means (\pm standard deviation) of results obtained from pigs ($n = 6$) in the PRRSV/swIAV (blue), PRRSV (red), swIAV (green) or Control (yellow) groups. Letters indicate that significant differences (with $p < 0.05$) were obtained between PRRSV/swIAV and (a) PRRSV and (b) swIAV and (c) Control groups and (d) and (e) between PRRSV and swIAV and the Control groups (respectively), SD0 (red arrow): PRRSV inoculation; SD8 (red arrow): swIAV inoculation.

Following swIAV stimulation, no significant difference in the number of IFN- γ -SC was observed between PRRSV/swIAV and swIAV groups, whatever the follow-up time point. At SD21 and SD26, the swIAV-specific CMI responses from both PRRSV/swIAV and swIAV groups were significantly different from the Control group (Figure 6b).

IFN- γ measurements in BALF were carried out using ELISAs because the induction of this cytokine in lungs could have revealed differences in CMI initiation; however, IFN- γ was not detected in any of the samples from infected pigs at the time they were taken.

Overall, it appeared that the CMI response specific to PRRSV was induced faster in super-infected pigs, whereas that specific to swIAV was not modified, as compared to PRRSV or swIAV single-infected groups.

3.7. Correlation Analyses

To explore the links between the clinical, virological and immunological parameters we monitored in this study, we performed PCAs and correlation tests using the different collected data.

Correlations related to PRRSV infection included data from PRRSV/swIAV and PRRSV groups. PCA revealed that IFN- α concentrations in BALF at SD12 were positively correlated with PRRSV-specific CMI responses (IFN- γ -SC) at SD26. Moreover, IFN- α concentrations in serum at SD9 and in BALF at SD12 were negatively correlated with PRRSV replication in BALF at SD12 (Figure 7a). These results were confirmed by a Spearman correlation analysis (Figure S1).

Correlations related to swIAV infection comprised data from PRRSV/swIAV and swIAV groups. PCA revealed that rectal temperature at SD9, IFN- α level at SD9, haptoglobin level at SD12 and percentage of granulocytes within BALC at SD12 were positively correlated between them, what was confirmed by a Spearman correlation analysis (Figure S2). Moreover, the humoral immune response measured in BALF at SD21 (swIAV-specific neutralizing, anti-hemagglutinin, and anti-swIAV IgG and IgA antibodies) was found to be anti-correlated with the above parameters (clinical signs, inflammatory and antiviral responses) (Figure 7b). Finally, rectal temperature or haptoglobin concentration were not related to swIAV multiplication, whether measured in nasal secretions or in lungs.

Therefore, altogether these data suggested that IFN- α response had probably played a primary role in the interference between both infections, it is noteworthy that the dispersions of data showed in both Figure 7a,b (represented by the blue, red and green ellipses) are much higher for the super-infected group compared to the single-infected groups,

suggesting that super-infection leads to more heterogeneous responses than PRRSV or swIAV single-infections.

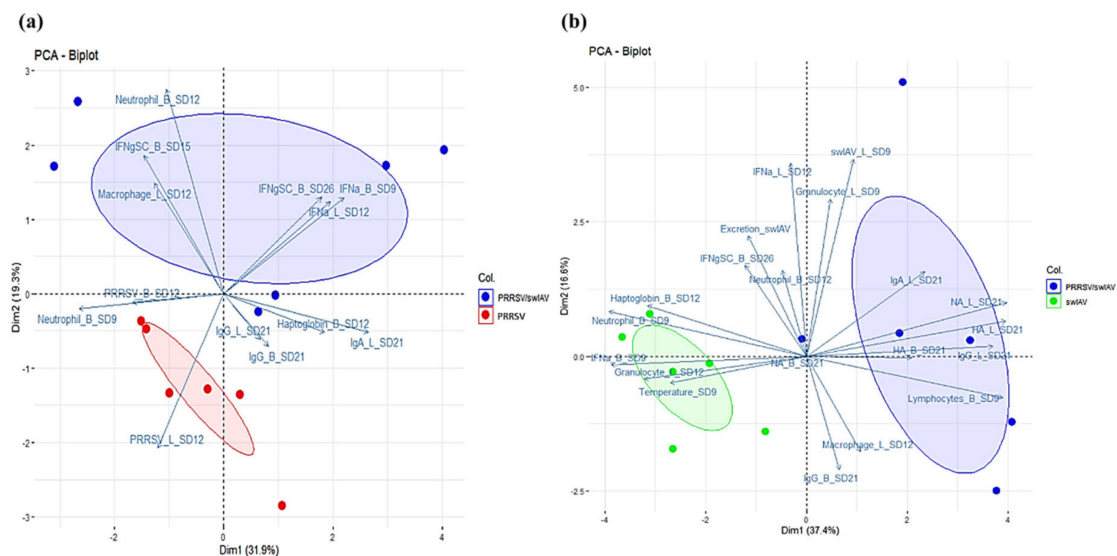


Figure 7. Principal component analysis (PCA) of the experimental variables of co-infected and single-infected pigs. **(a)** PCA biplot of PRRSV/swIAV and PRRSV pigs (13 factors). **(b)** PCA biplot of PRRSV/swIAV and swIAV pigs (20 factors). L: lungs; B: blood; SD: study day; PRRSV: PRRSV genomic load; swIAV: swIAV genomic load; HA: anti-HA antibodies; NA: swIAV-neutralizing antibodies. IFNgSC: CMI. Dim 1 is the axis representing the highest percentage of variance and Dim 2 represents the second axis. Each color dot (PRRSV/swIAV: blue, PRRSV: red or swIAV: green) represents the projection on the PCA of each pig. The ellipses depict the spread of the PCA data for PRRSV/swIAV, PRRSV or swIAV groups.

4. Discussion

In this study, we investigated the possible interference between PRRSV-1 and swIAV (H1N2) infections in an experimental model based on successive inoculations eight days apart. This model mimics as best as possible a situation most likely to be encountered in farms, taking into account the long-lasting and acute profiles of PRRSV and swIAV infections, respectively. Our laboratory has gained considerable experience of each single PRRSV and swIAV infection model [3,10,28], which made it possible to interpret the data obtained here in this super-infection context.

The first objective was to investigate the clinical and immuno-virological outcomes of a PRRSV-1 infection on a subsequent swIAV (H1N2) infection. In a previous study, where we inoculated H1N2 swIAV intratracheally to 9-week-old SPF pigs, reductions in food consumption and weight gain were evidenced during the first four days post-inoculation, before recovering [28]. In the present study, individual weighing was not performed daily; thus, we did not observe such an early impact of the swIAV infection. Nevertheless, what can be noticed is that any difference in growth performance was observed between the infected groups in the second and third weeks post-inoculation with swIAV. This suggests that even if swIAV infection had impacted food consumption and weight gain in the first days, PRRSV pre-infection had not exacerbated this swIAV infection outcome, and/or the PRRSV/swIAV group recovered at least as quickly as the swIAV group. In any case, hyperthermia and respiratory signs were observed in the swIAV group, as expected. In contrast, fewer clinical signs were observed in the super-infected group, suggesting an attenuation of H1N2 swIAV infection outcomes in the PRRSV-1 pre-infected pigs. Knowing that pig lungs are largely destabilized by PRRSV infection eight days post-inoculation [10], one might have expected an exacerbation of swIAV clinical signs in the PRRSV/swIAV group, rather than an attenuation. In addition, our results were consistent with most of the few experimental studies that previously investigated PRRSV-1/swIAV co-infection, because most of them did not evidence an exacerbation of the influenza disease [21,23,24]. Indeed, whereas a first study of Van Reeth et al. suggested an enhancement of clinical

disease in some conventional pigs inoculated with PRRSV-1 and H1N1 swIAV three days apart [20], large variations in the clinical responses were observed between individual pigs, which was confirmed in further experiments where inoculations were performed either three or seven days apart [21]. However, in colostrum-deprived caesarian-derived (CDCD) piglets inoculated in seven-day intervals, the differences with the single virus infections were negligible [21]. The same observation, i.e., no significant impact of PRRSV infection on subsequent swIAV infection, was reported when SPF piglets were inoculated with PRRSV-1 and H3N2 swIAV one week apart [23], or when conventional pigs were simultaneously inoculated with PRRSV-1 and H1N1 swIAV [24]. Interestingly, the dual infection was largely subclinical in conventional pigs inoculated with PRRSV-1 and H1N1 swIAV with a 14-day interval [21], in line with the attenuation of swIAV clinical signs we observed here in SPF pigs inoculated with PRRSV-1 and H1N2 swIAV eight days apart. Altogether, whereas the diversity of the experimental protocols could make it difficult to compare them, it seems that both the sanitary status of pigs (conventional, SPF or CDCD) as well as the time interval between inoculations (0, 3, 7, 8 or 14 days) can affect the clinical outcome of PRRSV-1/swIAV super-infection, whereas impact of the age of the animals (3 to 12 week old), the inoculation routes (nebulization, nasal, tracheal) or the swIAV subtype (H1N1, H3N2, H1N2) cannot be excluded at this stage. Although the inoculation route does not influence the outcomes of a single PRRSV infection [35], it is known that the severity of influenza disease is dependent upon swIAV delivery, as observed in our lab (unpublished results) and reported by others [36]. Tracheal inoculation is a technique which enables the reproduction of clinical outcomes observed in the field, the induction of marked clinical signs, as well as pulmonary inflammation, the observation of their attenuation in pigs pre-infected with PRRSV-1 is all the more relevant. Further comparative experimental assays using nebulization or shedder pigs as a more natural inoculation route for swIAV could be considered to confirm the results we obtained here.

The swIAV subtype may also play a role in the outcomes of the super-infection. Indeed, we have previously shown that the H1N2 swIAV strain used in this study was a little more pathogenic than an H1N1 swIAV strain, but outcomes of H1N2 infection in pigs infected with Mhp three weeks before the swIAV inoculation were not exacerbated, in contrast to outcomes of H1N1 infection in such a context of super-infection [37].

Correlation analyses suggested that the mitigation of clinical signs we have observed here in super-infected animals was positively correlated with the attenuation of the inflammatory response. Indeed, we observed a peak of haptoglobin in the swIAV group at 4 days post-swIAV infection as previously shown [28,38], but not in the PRRSV/swIAV group. Consistently, an influx of granulocytes was observed in the lungs of pigs from swIAV group as expected [28], whereas it was more limited in super-infected group. Interestingly, PCAs also indicated that the attenuation of clinical outcomes was not related to swIAV multiplication, because similar swIAV genomic loads were measured in the lungs of swIAV and PRRSV/swIAV groups. The absence of effect of PRRSV pre-infection on swIAV multiplication in lungs may result from differences in cellular targeting between the two viruses. In support of this hypothesis, it can be noted that in a co-infection study using two viruses replicating both in the lower respiratory epithelium, namely, porcine respiratory coronavirus (PRCV) and swIAV, PRCV infection strongly decreased swIAV replication [39]. In contrast, another study on PRRSV/PRCV co-infection showed no effect of PRRSV on PRCV replication and shedding [20].

However, clinical outcomes and inflammatory systemic response were found to be positively correlated with IFN- α levels. swIAV infection is known to be a high inducer of type-I IFN [40], whereas PRRSV is deemed to block such an induction [41]. Type-I IFN promotes both innate anti-viral defenses and adaptive immunity, while also bearing a deleterious role by inducing inflammatory responses which can lead to clinical manifestations [42]. Thus, the links that were evidenced here between inflammatory and IFN responses are in accordance with results previously reported by others in the context of swIAV single infections [28,43,44]. Nevertheless, the IFN- α level was significantly reduced

in super-infected pigs, as compared to swIAV-infected pigs, suggesting that PRRSV pre-infection interfered with IFN- α induction. This result is consistent with an *in vitro* study showing that macrophages infected with PRRSV and then with a swine alphacoronavirus, which is a good IFN- α inducer as swIAV, failed to produce the antiviral cytokine [45]. Interestingly, another *in vitro* investigation indicated that PRRSV could interfere with the JAK-STAT signaling pathway in newborn porcine tracheal (NPTr) epithelial cells, even without entering these cells, leading to a sub-expression of IFN-stimulated genes after infection with swIAV [46].

Similar levels of antibodies directed against H1N2 swIAV were measured in sera from swIAV and PRRSV/swIAV groups, as reported by others when comparing humoral responses at the systemic level in H1N1-infected and PRRSV/H1N1 co-infected pigs [24]. Conversely, we detected higher levels of anti-swIAV antibodies in BALF from the PRRSV/swIAV group, as compared to the swIAV group, at SD21. PRRSV infection induces polyclonal hypergammaglobulinemia [47]; therefore, this phenomenon may have played a role in the high production of anti-swIAV antibodies in BALF from the super-infected group. However, no correlation between the levels of anti-swIAV antibodies in BALF and swIAV multiplication was observed, suggesting that this huge humoral response had no impact on swIAV clearance. In parallel, a slight induction of IL-10 was measured in the lungs of more pigs from the PRRSV/swIAV group, than from the single-infected group, as already observed by others after PRRSV/swIAV co-infection [48]. However, due to the low sensitivity of IL-10 detection in BALF by ELISA, additional comparative analyses of IL-10 using other methods such as gene expression quantification in BALCs of infected groups [10] should be considered to confirm its higher induction in the lungs of super-infected pigs.

The second objective of this study was to investigate the effect of swIAV infection on the course of an ongoing PRRSV infection. Interestingly, a transient but strong decrease in PRRSV genomic load was observed in the lungs of PRRSV/swIAV superinfected pigs, as compared to PRRSV single-infected pigs, in the few days after swIAV inoculation, consistent with other studies regarding PRRSV/swIAV coinfection in pigs [49]. Host target cells for PRRSV are alveolar macrophages [8], whereas swIAV mainly infects epithelial cells of upper and lower respiratory tracts [13]; therefore, this viral interference should depend on indirect mechanisms. Knowing that PRRSV is very sensitive to IFN- α [45], and as supported by correlation analyses, the impact that swIAV infection had on PRRSV multiplication was probably linked to the induction of IFN- α in the lungs of PRRSV/swIAV co-infected pigs. As mentioned above, IFN- α levels were strongly reduced as compared to those measured in swIAV-infected pigs, but still higher than usually measured after PRRSV infection. These results are completely in line with a previous study showing that the induction of IFN- α through a non-replicating adenovirus (Ad5-IFN- α) inhibited the replication of a PRRSV-2 strain in pigs inoculated one-day later [50]. In the same way, we showed, in a recent study, that a concomitant swIAV infection can temporarily inhibit the replication of a PRRSV-1-modified live vaccine, probably through IFN- α induction [51]. In contrast, the fact that the IFN- α concentration was low in blood could explain why the PRRSV genomic load was not affected at the systemic level. Nevertheless, in addition to IFN- α , the role of other cytokines in decreasing PRRSV multiplication in lungs, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), cannot be excluded. Even though we were not able to detect any TNF- α in the lungs after H1N2 inoculation in a previous study [28], others have reported that swIAV infection could lead to an increase in TNF- α concentration in the lungs [48]. If this happened, TNF- α could have played a role because it was shown to have an antiviral effect on PRRSV [52,53].

No difference between PRRSV and PRRSV/swIAV groups was observed regarding the humoral response against PRRSV, as also previously described [24]. However, we observed that the number of PRRSV-specific IFN- γ -SCs increased faster in the blood of pigs from the PRRSV/swIAV group as compared to the PRRSV group. A correlation was found between the IFN- α level and the PRRSV-specific CMI response; therefore, it could

be hypothesized that IFN- α induction linked to swIAV infection might have stimulated the cellular response against PRRSV. This is supported by another study that also showed a significant increase in the number of PRRSV-specific IFN- γ -SCs in pigs injected with an Ad5-pIFN- α at the time of PRRSV inoculation, as compared to single-infected pigs [54]. Beyond innate anti-viral defenses, IFN- α can also activate the CMI response by stimulating the dendritic cells that trigger antigen-specific T cell proliferation [55].

In conclusion, in our experimental conditions, this study demonstrated an interplay between PRRSV and swIAV infections, with a two-way interference that most likely involved IFN- α in different roles. On the one hand, reductions in IFN- α levels in superinfected pigs, as compared to swIAV-infected pigs, would have contributed to the attenuation of influenza-like illness through the impairment of inflammatory response. On the other hand, increases in IFN- α in super-infected pigs, as compared to PRRSV single-infected pigs, would have counteracted PRRSV multiplication and stimulated the induction of CMI specific to PRRSV. However, other cytokines could have played a role in viral interference, which deserves further investigation. Additionally, as underlined previously, the results we obtained here might have been different when using other viral subtypes or another delay between inoculations or pigs with a different health status. Further studies evaluating the role of each of these parameters in the outcomes of super-infection are thus still needed.

However, even if such an experimental super-infection model may not still represent the complexity of the situation encountered in the field [2], and because other factors so far unknown could also play a role in the variations noticed in the responses between individual pigs, this study provides new knowledge about interactions between two respiratory RNA viruses of importance in pig production. It suggests that an antagonistic, but not a synergistic or additive, effect may result from a co-infection, probably depending on event chronology, as also recently evidenced *in vitro* in a study dedicated to dual infection with swIAV (H3N2) and porcine respiratory coronavirus [56]. Although further investigations are needed to more deeply decipher the complex interplays between PRRSV and swIAV infections, these findings provide new insight into PRDC regulation in pigs [2]. They should be relevant as well for the comprehensive understanding of respiratory virus co-infections in other species, such as within bovine respiratory disease in cattle [57], or in humans where co-infections may occur with influenza A virus and other viruses [58], among which some exhibit an ability to interfere with the IFN pathway.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v13112169/s1>. Figure S1: Correlation analysis between variables obtained in the PRRSV/swIAV and PRRSV groups. Spearman's correlation coefficients between haptoglobin concentration in blood at SD12, PRRSV genomic load in the blood and lungs at SD12, concentration of IFN- α in blood at SD9 and in the lungs at SD12, the percentage of neutrophils in the blood at SD9, the percentage of granulocytes in the lungs at SD12, the percentage of macrophages in the lungs at SD12, the level of anti-PRRSV IgG in blood and lungs at SD21, the level of anti-PRRSV IgA in the lungs at SD21, and the number of IFN- γ -SCs in the blood at SD15 and SD26. Grey cells indicate that the correlation was significant at $p < 0.05$. B: blood, L: lung, SD: study day. Figure S2: Correlation analysis between parameters obtained in the PRRSV/swIAV and swIAV pigs. Spearman's correlation coefficients between rectal temperature at SD9, the concentration of haptoglobin in blood at SD12, the swIAV genomic load in lungs at SD9, the duration of swIAV excretion (in days), the concentration of IFN- α in the blood at SD9 and in the lungs at SD12, the percentage of neutrophils in the blood at SD9 and SD12, the percentage of granulocytes in the lungs at SD9 and SD12, the percentage of macrophages in the lungs at SD12, the percentage of lymphocytes in the blood at SD9, the levels of swIAV-specific IgG, IgA, anti-HA, neutralizing antibodies in the lungs and in serum at SD21, the number of IFN- γ -SC per million PBMC (in blood) at SD26. Grey cells indicate that the correlation is significant at $p < 0.05$. B: blood, L: lungs, SD: study days. Figure S3: Detection of anti-PRRSV antibodies in serum and BALF from infected groups. (a) Anti-PRRSV IgG in serum, (b) Anti-PRRSV IgG in BALF, (c) Anti-PRRSV IgA in BALF. Data are reported as the means (\pm standard deviation) of results obtained from pigs ($n = 6$) in the PRRSV/swIAV (blue) and PRRSV (red) groups. SD0 (red arrow): PRRSV inoculation; SD8 (green arrow): swIAV inoculation. Figure S4: Anti-swIAV antibodies in serum from infected

groups. (a) Detection of anti swIAV IgG in serum; (b) Titration of anti-HA antibodies in serum; (c) Titration of swIAV-specific neutralizing antibodies in serum. Data are reported as the means (\pm standard deviation) of results obtained from pigs ($n = 6$) in the PRRSV/swIAV (blue) and swIAV (green) groups. SD0 (red arrow): PRRSV inoculation; SD8 (green arrow): swIAV inoculation.

Author Contributions: Conceptualization, O.B. and G.S.; methodology, O.B., G.S., C.D., P.R. and J.B.; validation, O.B., G.S., C.D., P.R. and J.B.; formal analysis, C.D., P.R., S.G., S.Q., S.M., M.L.D., N.B. and J.B.; investigation, O.B., G.S., C.D., P.R. and J.B.; data curation, J.B.; writing—original draft preparation, J.B., O.B., G.S., C.D. and P.R.; writing—review and editing: O.B., G.S., F.P., C.D., P.R., S.G., S.Q., S.M., M.L.D. and J.B.; visualization, J.B.; supervision, O.B., G.S. and F.P.; project administration, O.B. and G.S.; funding acquisition, O.B. and G.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: J.B. received a PhD thesis fellowship from Rennes 1 University (UNIR), France, in the framework of grant agreements with Région Bretagne, Conseil Départemental des Côtes d’Armor and Saint-Brieuc Armor Agglomération, France.

Institutional Review Board Statement: The animal experiment was authorized by the French Ministry for Research (authorization no. APAFIS#19874-2019032011429342 v3) and approved by the National Committee for Ethics in Animal Experimentation ANSES/ENVA/UPEC n°16 (approval no. 19-023#19874).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are indebted to Gérald Lediguerher, Nadège Morin, Angélique Moro and Yann Bailly for animal care.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Opriessnig, T.; Gimenez-Lirola, L.G.; Halbur, P.G. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim. Health Res. Rev.* **2011**, *12*, 133–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Saade, G.; Deblanc, C.; Bougon, J.; Marois-Crehan, C.; Fablet, C.; Auray, G.; Belloc, C.; Leblanc-Maridor, M.; Gagnon, C.A.; Zhu, J.; et al. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Vet. Res.* **2020**, *51*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Deblanc, C.; Delgado-Ortega, M.; Gorin, S.; Berri, M.; Paboeuf, F.; Berthon, P.; Herrler, G.; Meurens, F.; Simon, G. Mycoplasma hyopneumoniae does not affect the interferon-related anti-viral response but predisposes the pig to a higher level of inflammation following swine influenza virus infection. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 2501–2515. [[CrossRef](#)]
4. Van Reeth, K.; Brown, I.H.; Dürrwald, R.; Foni, E.; Labarque, G.; Lenihan, P.; Maldonado, J.; Markowska-Daniel, I.; Pensaert, M.; Pospisil, Z.; et al. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002–2003. *Influenza Other Respir. Viruses* **2008**, *2*, 99–105. [[CrossRef](#)]
5. Fraile, L.; Alegre, A.; López-Jiménez, R.; Nofrarias, M.; Segalés, J. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Vet. J.* **2010**, *184*, 326–333. [[CrossRef](#)]
6. Adams, M.J.; Lefkowitz, E.J.; King, A.M.Q.; Harrach, B.; Harrison, R.L.; Knowles, N.J.; Kropinski, A.M.; Krupovic, M.; Kuhn, J.H.; Mushegian, A.R.; et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 2505–2538. [[CrossRef](#)]
7. Siddell, S.G.; Walker, P.J.; Lefkowitz, E.J.; Mushegian, A.R.; Adams, M.J.; Dutilh, B.E.; Gorbalenya, A.E.; Harrach, B.; Harrison, R.L.; Junglen, S.; et al. Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018). *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 943–946. [[CrossRef](#)]
8. Lunney, J.K.; Fang, Y.; Ladinig, A.; Chen, N.; Li, Y.; Rowland, B.; Renukaradhya, G.J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2016**, *4*, 129–154. [[CrossRef](#)]
9. Wills, R.W.; Doster, A.R.; Galeota, J.A.; Sur, J.H.; Osorio, F.A. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 58–62. [[CrossRef](#)]
10. Renson, P.; Rose, N.; Le Dimna, M.; Mahe, S.; Keranflec’h, A.; Paboeuf, F.; Belloc, C.; Le Potier, M.F.; Bourry, O. Dynamic changes in bronchoalveolar macrophages and cytokines during infection of pigs with a highly or low pathogenic genotype 1 PRRSV strain. *Vet. Res.* **2017**, *48*, 15. [[CrossRef](#)]
11. Balasuriya, U.B.; Carossino, M. Reproductive effects of arteriviruses: Equine arteritis virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections. *Curr. Opin. Virol.* **2017**, *27*, 57–70. [[CrossRef](#)]

12. Butler, J.E.; Lager, K.M.; Golde, W.; Faaberg, K.S.; Sinkora, M.; Loving, C.; Zhang, Y.I. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An immune dysregulatory pandemic. *Immunol. Res.* **2014**, *59*, 81–108. [CrossRef]
13. Crisci, E.; Mussa, T.; Fraile, L.; Montoya, M. Review: Influenza virus in pigs. *Mol. Immunol.* **2013**, *55*, 200–211. [CrossRef]
14. Lewis, N.S.; Russell, C.A.; Langat, P.; Anderson, T.K.; Berger, K.; Bielejec, F.; Burke, D.F.; Dudas, G.; Fonville, J.M.; Fouchier, R.A.; et al. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. *eLife* **2016**, *5*, e12217. [CrossRef]
15. Watson, S.J.; Langat, P.; Reid, S.M.; Lam, T.T.; Cotten, M.; Kelly, M.; Van Reeth, K.; Qiu, Y.; Simon, G.; Bonin, E.; et al. Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J. Virol.* **2015**, *89*, 9920–9931. [CrossRef]
16. Van Reeth, K.; Brown, I.H.; Olsen, C.W. Influenza Virus. In *Diseases of Swine*, 10th ed.; Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2012; pp. 557–571.
17. Crisci, E.; Fraile, L.; Montoya, M. Cellular Innate Immunity against PRRSV and Swine Influenza Viruses. *Vet. Sci.* **2019**, *6*, 26. [CrossRef]
18. Fablet, C.; Marois, C.; Kuntz-Simon, G.; Rose, N.; Dorenlor, V.; Eono, F.; Eveno, E.; Jolly, J.P.; Le Devendec, L.; Tocqueville, V.; et al. Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Vet. Microbiol.* **2011**, *147*, 329–339. [CrossRef]
19. Fablet, C.; Marois-Créhan, C.; Simon, G.; Grasland, B.; Jestin, A.; Kobisch, M.; Madec, F.; Rose, N. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. *Vet. Microbiol.* **2012**, *157*, 152–163. [CrossRef]
20. Van Reeth, K.; Nauwynck, H.; Pensaert, M. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: A clinical and virological study. *Vet. Microbiol.* **1996**, *48*, 325–335. [CrossRef]
21. Van Reeth, K.; Nauwynck, H.; Pensaert, M. Clinical effects of experimental dual infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by swine influenza virus in conventional and colostrum-deprived pigs. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **2001**, *48*, 283–292. [CrossRef]
22. Kitikoon, P.; Vincent, A.L.; Jones, K.R.; Nilubol, D.; Yu, S.; Janke, B.H.; Thacker, B.J.; Thacker, E.L. Vaccine efficacy and immune response to swine influenza virus challenge in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the time of SIV vaccination. *Vet. Microbiol.* **2009**, *139*, 235–244. [CrossRef]
23. Pol, J.M.; van Leengoed, L.A.; Stockhofe, N.; Kok, G.; Wensvoort, G. Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/Actinobacillus pleuropneumoniae in the respiratory tract. *Vet. Microbiol.* **1997**, *55*, 259–264. [CrossRef]
24. Pomorska-Mol, M.; Podgorska, K.; Czyzewska-Dors, E.; Turlewicz-Podbielska, H.; Gogulski, M.; Wlodarek, J.; Lukomska, A. Kinetics of single and dual simultaneous infection of pigs with swine influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Intern. Med.* **2020**, *34*, 1903–1913. [CrossRef]
25. Fablet, C.; Marois-Crehan, C.; Grasland, B.; Simon, G.; Rose, N. Factors associated with herd-level PRRSV infection and age-time to seroconversion in farrow-to-finish herds. *Vet. Microbiol.* **2016**, *192*, 10–20. [CrossRef] [PubMed]
26. Kärber, G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak.* **1931**, *162*, 480–483. [CrossRef]
27. Reed, L.J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* **1938**, *27*, 493–497. [CrossRef]
28. Deblanc, C.; Quéguiner, S.; Gorin, S.; Chastagner, A.; Hervé, S.; Paboeuf, F.; Simon, G. Evaluation of the Pathogenicity and the Escape from Vaccine Protection of a New Antigenic Variant Derived from the European Human-Like Reassortant Swine H1N2 Influenza Virus. *Viruses* **2020**, *12*, 1155. [CrossRef]
29. Madec, F.; Kobisch, M. Bilan lésionnel des poumons de porcs charcutiers à l’abattoir. *J. Rech. Porcin. France* **1982**, *14*, 405–412.
30. Rose, N.; Renson, P.; Andraud, M.; Paboeuf, F.; Le Potier, M.F.; Bourry, O. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) modified-live vaccine reduces virus transmission in experimental conditions. *Vaccine* **2015**, *33*, 2493–2499. [CrossRef]
31. Kvisgaard, L.K.; Larsen, L.E.; Hjulsager, C.K.; Bøtner, A.; Rathkjen, P.H.; Heegaard, P.M.H.; Bisgaard, N.P.; Nielsen, J.; Hansen, M.S. Genetic and biological characterization of a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 2 (PRRSV-2) causing significant clinical disease in the field. *Vet. Microbiol.* **2017**, *211*, 74–83. [CrossRef]
32. Cador, C.; Hervé, S.; Andraud, M.; Gorin, S.; Paboeuf, F.; Barbier, N.; Quéguiner, S.; Deblanc, C.; Simon, G.; Rose, N. Maternally-derived antibodies do not prevent transmission of swine influenza A virus between pigs. *Vet. Res.* **2016**, *47*, 86. [CrossRef] [PubMed]
33. Jamin, A.; Gorin, S.; Le Potier, M.F.; Kuntz-Simon, G. Characterization of conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2006**, *114*, 224–237. [CrossRef] [PubMed]
34. World Organisation for Animal Health (OIE). Influenza A virus of swine. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019*; World Organisation for Animal Health: Paris, France, 2018; pp. 1594–1607. Available online: <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/> (accessed on 16 June 2021).
35. Yoon, K.J.; Zimmerman, J.J.; Chang, C.C.; Cancel-Tirado, S.; Harmon, K.M.; McGinley, M.J. Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in young swine. *Vet. Res.* **1999**, *30*, 629–638. [PubMed]
36. Van Reeth, K.; Ma, W. Swine influenza virus vaccines: To change or not to change—that’s the question. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *370*, 173–200. [CrossRef]

37. Deblanc, C.; Gorin, S.; Quéguiner, S.; Gautier-Bouchardon, A.V.; Ferré, S.; Amenna, N.; Cariolet, R.; Simon, G. Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* modifies outcomes of infection with European swine influenza virus of H1N1, but not H1N2, subtype. *Vet. Microbiol.* **2012**, *157*, 96–105. [[CrossRef](#)]
38. Pomorska-Mol, M.; Markowska-Daniel, I.; Kwit, K. Immune and acute phase response in pigs experimentally infected with H1N2 swine influenza virus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, *66*, 334–342. [[CrossRef](#)]
39. Van Reeth, K.; Pensaert, M.B. Porcine respiratory coronavirus-mediated interference against influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. *Am. J. Vet. Res.* **1994**, *55*, 1275–1281.
40. Wu, W.; Metcalf, J.P. The Role of Type I IFNs in Influenza: Antiviral Superheroes or Immunopathogenic Villains? *J. Innate Immun.* **2020**, *12*, 1–11. [[CrossRef](#)]
41. Du, T.; Nan, Y.; Xiao, S.; Zhao, Q.; Zhou, E.M. Antiviral Strategies against PRRSV Infection. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 968–979. [[CrossRef](#)]
42. Tomasello, E.; Pollet, E.; Vu Manh, T.P.; Uze, G.; Dalod, M. Harnessing Mechanistic Knowledge on Beneficial Versus Deleterious IFN-I Effects to Design Innovative Immunotherapies Targeting Cytokine Activity to Specific Cell Types. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 526. [[CrossRef](#)]
43. Barbe, F.; Atanasova, K.; Van Reeth, K. Cytokines and acute phase proteins associated with acute swine influenza infection in pigs. *Vet. J.* **2011**, *187*, 48–53. [[CrossRef](#)]
44. Barbé, F.; Saelens, X.; Braeckmans, D.; Lefèvre, F.; Reeth, K.V. Role of IFN- α during the acute stage of a swine influenza virus infection. *Res. Vet. Sci.* **2010**, *88*, 172–178. [[CrossRef](#)]
45. Albina, E.; Carrat, C.; Charley, B. Interferon- α response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Interferon Cytokine Res.* **1998**, *18*, 485–490. [[CrossRef](#)]
46. Saade, G.; Menard, D.; Hervet, C.; Renson, P.; Hue, E.; Zhu, J.; Dubreil, L.; Paillot, R.; Pronost, S.; Bourry, O.; et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Interferes with Swine Influenza A Virus Infection of Epithelial Cells. *Vaccines* **2020**, *8*, 508. [[CrossRef](#)]
47. Plagemann, P.G.; Rowland, R.R.; Cafruny, W.A. Polyclonal hypergammaglobulinemia and formation of hydrophobic immune complexes in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected and uninfected pigs. *Viral. Immunol.* **2005**, *18*, 138–147. [[CrossRef](#)]
48. Turlewicz-Podbielska, H.; Czyżewska-Dors, E.; Pomorska-Mól, M. Respiratory viral infections drive different lung cytokine profiles in pigs. *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 5. [[CrossRef](#)]
49. Czyżewska-Dors, E.; Pomorska-Mól, M.; Dors, A.; Pluta, A.; Podgórska, K.; Kwit, K.; Stasiak, E.; Łukomska, A. Proinflammatory cytokine changes in bronchoalveolar lavage fluid cells isolated from pigs infected solely with porcine reproductive and respiratory syndrome virus or co-infected with swine influenza virus. *J. Vet. Res.* **2019**, *63*, 489–495. [[CrossRef](#)]
50. Brockmeier, S.L.; Lager, K.M.; Grubman, M.J.; Brough, D.E.; Etyreddy, D.; Sacco, R.E.; Gauger, P.C.; Loving, C.L.; Vorwald, A.C.; Kehrl, M.E., Jr.; et al. Adenovirus-mediated expression of interferon- α delays viral replication and reduces disease signs in swine challenged with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol.* **2009**, *22*, 173–180. [[CrossRef](#)]
51. Renson, P.; Deblanc, C.; Bougon, J.; Le Dimna, M.; Gorin, S.; Mahé, S.; Barbier, N.; Paboeuf, F.; Simon, G.; Bourry, O. Concomitant Swine Influenza A Virus Infection Alters PRRSV1 MLV Viremia in Piglets but Does Not Interfere with Vaccine Protection in Experimental Conditions. *Vaccines* **2021**, *9*, 356. [[CrossRef](#)]
52. Li, R.; Guo, L.; Gu, W.; Luo, X.; Zhang, J.; Xu, Y.; Tian, Z.; Feng, L.; Wang, Y. Production of porcine TNF α by ADAM17-mediated cleavage negatively regulates porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Immunol. Res.* **2016**, *64*, 711–720. [[CrossRef](#)]
53. Seo, S.H.; Webster, R.G. Tumor necrosis factor α exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells. *J. Virol.* **2002**, *76*, 1071–1076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Brockmeier, S.L.; Loving, C.L.; Nelson, E.A.; Miller, L.C.; Nicholson, T.L.; Register, K.B.; Grubman, M.J.; Brough, D.E.; Kehrl, M.E., Jr. The presence of alpha interferon at the time of infection alters the innate and adaptive immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Vaccine Immunol.* **2012**, *19*, 508–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Le Bon, A.; Tough, D.F. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, *14*, 432–436. [[CrossRef](#)]
56. Peng, J.Y.; Shin, D.L.; Li, G.; Wu, N.H.; Herrler, G. Time-dependent viral interference between influenza virus and coronavirus in the infection of differentiated porcine airway epithelial cells. *Virulence* **2021**, *12*, 1111–1121. [[CrossRef](#)]
57. Nissly, R.H.; Zaman, N.; Ibrahim, P.A.S.; McDaniel, K.; Lim, L.; Kiser, J.N.; Bird, I.; Chothe, S.K.; Bhushan, G.L.; Vandegrift, K.; et al. Influenza C and D viral load in cattle correlates with bovine respiratory disease (BRD): Emerging role of orthomyxoviruses in the pathogenesis of BRD. *Virology* **2020**, *551*, 10–15. [[CrossRef](#)]
58. Drori, Y.; Jacob-Hirsch, J.; Pando, R.; Glatman-Freedman, A.; Friedman, N.; Mendelson, E.; Mandelboim, M. Influenza A Virus Inhibits RSV Infection via a Two-Wave Expression of IFIT Proteins. *Viruses* **2020**, *12*, 1171. [[CrossRef](#)]

Supplementary Materials

	Haptoglobin_B_SD12	PRRSV_B_SD12	PRRSV_L_SD12	IFNa_B_SD9	IFNa_L_SD12	Neutrophil_B_SD9	Granulocyte_L_SD12	Macrophage_L_SD12	IgG_B_SD21	IgG_L_SD21	IgA_L_SD21	IFNgSC_B_SD15	IFNgSC_B_SD26
Haptoglobin B SD12	1.00	-0.05	-0.15	0.17	0.03	-0.53	-0.28	0.12	0.42	0.04	0.39	-0.02	-0.39
PRRSV B SD12		1.00	0.19	-0.07	-0.64	0.53	-0.04	0.35	-0.08	-0.14	-0.41	-0.06	-0.45
PRRSV L SD12			1.00	-0.73	-0.67	0.26	-0.25	0.04	-0.31	0.06	-0.03	0.07	-0.36
IFNa B SD9				1.00	0.63	-0.39	0.02	0.17	0.22	0.24	0.44	-0.12	0.30
IFNa L SD12					1.00	-0.39	0.35	0.12	0.19	0.32	0.34	-0.05	0.58
Neutrophil B SD9						1.00	0.29	0.32	-0.10	-0.06	-0.77	0.30	-0.40
Granulocyte L SD12							1.00	0.44	-0.40	-0.03	-0.38	0.55	0.09
Macrophage L SD12								1.00	-0.24	-0.15	-0.15	0.21	-0.44
IgG B SD21									1.00	0.30	0.02	-0.25	0.01
IgG L SD21										1.00	0.51	0.17	0.21
IgA L SD21											1.00	-0.15	0.28
IFNgSC B SD15												1.00	-0.47
IFNgSC B SD26													1.00

Figure S1. Correlation analysis between variables obtained in PRRSV/swIAV and PRRSV groups. Spearman’s correlation coefficients between haptoglobin concentration in blood at SD12, PRRSV genomic load in blood and lungs at SD12, concentration of IFN- α in blood at SD9 and in lungs at SD12, the percentage of neutrophils in blood at SD9, the percentage of granulocytes in lungs at SD12, the percentage of macrophages in lungs at SD12, the level of anti-PRRSV IgG in blood and lungs at SD21, the level of anti-PRRSV IgA in lungs at SD21, the number of IFN- γ -SC in blood at SD15 and SD26. Grey cells indicate that the correlation is significant at $p < 0.05$. B: blood, L: lung, SD: Study day

	Temperature_SD9	Haptoglobin_B_SD12	swIAV_L_SD9	Excretion_swIAV	IFNa_B_SD9	IFNa_L_SD12	Neutrophil_B_SD9	Neutrophil_L_SD12	Granulocyte_L_SD9	Granulocyte_L_SD12	Macrophage_L_SD12	Lymphocyte_B_SD9	IgG_B_SD21	HA_B_SD21	NA_B_SD21	IgG_L_SD21	IgA_L_SD21	HA_L_SD21	NA_L_SD21	IFNgSC_B_SD26
Temperature SD9	1.00	0.57	-0.01	0.00	0.86	0.14	0.82	-0.02	-0.11	0.83	0.58	-0.80	0.07	-0.18	0.10	-0.61	-0.36	-0.78	-0.82	0.24
Haptoglobin B SD12		1.00	-0.08	-0.10	0.63	-0.20	0.61	0.44	0.09	0.60	0.19	-0.60	-0.07	0.00	0.25	-0.56	0.10	-0.61	-0.52	0.16
swIAV L SD9			1.00	0.20	0.12	0.78	0.20	0.23	0.74	-0.11	-0.18	-0.17	0.20	0.15	-0.16	0.26	0.33	0.17	0.14	0.61
Excretion swIAV				1.00	0.26	0.54	0.35	-0.04	0.22	0.22	0.16	-0.41	-0.21	-0.46	-0.03	-0.26	-0.20	-0.20	-0.26	0.27
IFNa B SD9					1.00	0.23	0.90	0.36	-0.03	0.78	0.29	-0.88	-0.19	-0.26	0.17	-0.77	-0.31	-0.81	-0.78	0.52
IFNa L SD12						1.00	0.32	-0.01	0.65	0.12	0.11	-0.29	-0.03	-0.34	0.22	0.16	0.04	-0.05	-0.15	0.31
Neutrophil B SD9							1.00	0.17	0.16	0.89	0.41	-0.99	0.02	-0.31	0.13	-0.71	-0.31	-0.72	-0.81	0.49
Neutrophil L SD12								1.00	0.15	0.12	-0.37	-0.15	0.37	-0.05	0.02	-0.43	0.15	-0.32	-0.11	0.48
Granulocyte L SD9									1.00	0.10	0.27	-0.13	-0.12	0.00	-0.15	0.32	0.59	0.26	0.14	0.25
Granulocyte L SD12										1.00	0.51	-0.90	0.11	-0.48	-0.11	-0.80	-0.40	-0.84	-0.93	0.29
Macrophage L SD12											1.00	-0.42	0.23	0.00	0.41	-0.30	-0.09	-0.24	-0.49	-0.09
Lymphocyte B SD9												1.00	-0.04	0.31	-0.11	0.73	0.33	0.72	0.81	-0.50
IgG B SD21													1.00	0.23	-0.10	0.27	0.13	0.17	0.07	0.08
HA B SD21														1.00	0.52	0.26	0.36	0.52	0.52	0.20
NA B SD21															1.00	-0.27	-0.07	0.07	-0.01	0.03
IgG L SD21																1.00	0.59	0.82	0.81	-0.34
IgA L SD21																	1.00	0.57	0.65	0.10
HA L SD21																		1.00	0.94	-0.14
NA L SD21																			1.00	-0.09
IFNgSC B SD26																				1.00

Figure S2. Correlation analysis between parameters obtained in PRRSV/swIAV and swIAV pigs. Spearman’s correlation coefficients between rectal temperature at SD9, the concentration of haptoglobin in blood at SD12, the swIAV genomic load in lungs at SD9, the duration of swIAV excretion (in days), the concentration of IFN- α in blood at SD9 and in lungs at SD12, the percentage of neutrophils in blood at SD9 and SD12, the percentage of granulocytes in lungs at SD9 and SD12, the percentage of macrophages in lungs at SD12, the percentage of lymphocytes in blood at SD9, the levels of swIAV-specific IgG, IgA, anti-HA, neutralizing antibodies in lungs and in serum at SD21, the number of IFN- γ -SC per million PBMC (in blood) at SD26. Grey cells indicate that the correlation is significant at $p < 0.05$. B: blood, L: lungs, SD: study days.

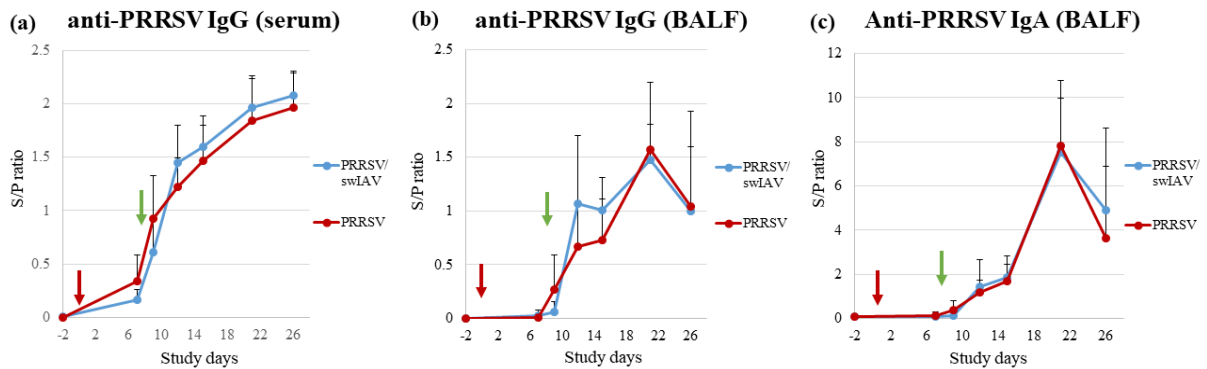


Figure S3. Detection of anti-PRRSV antibodies in serum and BALF from infected groups. (a) Anti-PRRSV IgG in serum, (b) Anti-PRRSV IgG in BALF, (c) Anti-PRRSV IgA in BALF. Data are reported as the means (\pm standard deviation) of results obtained from pigs ($n=6$) in PRRSV/swIAV (blue) and PRRSV (red) groups. SD0 (red arrow): PRRSV inoculation; SD8 (green arrow): swIAV inoculation.

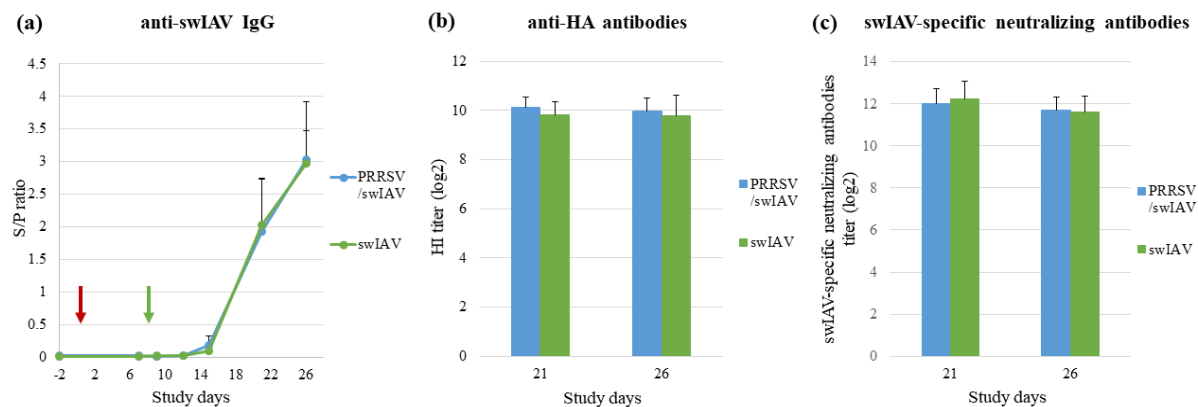


Figure S4. Anti-swIAV antibodies in serum from infected groups. (a) Detection of anti swIAV IgG in serum; (b) Titration of anti-HA antibodies in serum; (c) Titration of swIAV-specific neutralizing anti-bodies in serum. Data are reported as the means (\pm standard deviation) of results obtained from pigs ($n=6$) in PRRSV/swIAV (blue) and swIAV (green) groups. SD0 (red arrow): PRRSV inoculation; SD8 (green arrow): swIAV inoculation.

Conclusion

Dans un premier temps, l'étude de l'impact d'une pré-infection SDRPV sur une infection subséquente par le swIAV a permis de mettre en évidence une diminution de l'hyperthermie et des signes respiratoires (toux, éternuement, respiration rapide) à J9 (lendemain de l'inoculation du virus grippal) pour le groupe co-infecté, comparativement au groupe mono-infecté swIAV. De la même manière, lorsque nous avons analysé l'impact de la co-infection SDRPV/swIAV sur la réponse inflammatoire et antivirale au niveau systémique, nous avons observé une atténuation de ces réponses vis-à-vis de l'infection à swIAV, au cours de la co-infection, comparativement à la mono-infection swIAV. Un léger retard de l'excrétion du swIAV a été observé, entre J9 et J10, lors de cette co-infection par rapport au groupe mono-infecté. En ce qui concerne la réponse à médiation humorale (IgG, IgA, anti-HA, et anticorps neutralisants) vis-à-vis du swIAV, les porcs co-infectés présentaient une réponse plus forte et plus rapide au niveau pulmonaire à partir de J21.

Dans un deuxième temps, l'étude de l'impact de l'infection swIAV sur le devenir de l'infection SDRPV en cours, n'a montré aucune différence dans la charge génomique du SDRPV entre les porcs co-infectés et mono-infectés au niveau systémique. A contrario, il a été observé une diminution de la multiplication du SDRPV dans les poumons des porcs co-infectés, comparativement aux porcs SDRPV, entre J9 et J12. La réponse antivirale (IFN- α) était plus importante pour les porcs co-infectés que pour les porcs mono-infectés SDRPV. Pour la réponse à médiation humorale, il n'a été observé aucune différence entre les taux d'anticorps dirigés contre le SDRPV chez les porcs co-infectés et chez les porcs mono-infectés, que ce soit dans les sérums ou dans les surnageants de BAL. La réponse à médiation cellulaire spécifique du SDRPV a été induite plus rapidement après co-infection qu'après mono-infection SDRPV.

Les analyses de corrélation ont suggéré un rôle important de l'IFN- α dans cette interférence virale bidirectionnelle.

Même si notre modèle expérimental de co-infection ne représente pas toute la complexité de la situation rencontrée sur le terrain, car d'autres facteurs encore inconnus pourraient également jouer un rôle dans la variation des réponses observées chez les porcs co-infectés. Cette étude semble nous montrer l'existence d'une interférence bidirectionnelle entre ces deux infections virales conduisant à une atténuation de la sévérité de la grippe, à une diminution de la multiplication pulmonaire du SDRPV et une accélération de l'induction de la réponse à médiation cellulaire vis-à-vis du SDRPV, avec un rôle potentiellement important de l'IFN- α .



CHAPITRE 2

Etude de la co-infection SDRPV/swIAV dans un modèle de co-culture de macrophages alvéolaires et de cellules épithéliales de trachée

Introduction

L'étude *in vivo* de l'impact immuno-virologique des inoculations successives SDRPV/swIAV (cf chapitre 1) a permis de mettre en évidence une interférence mutuelle entre ces deux infections virales avec un rôle potentiellement important de l'IFN- α . De précédentes études *in vitro* (sur PAM, macrophages alvéolaires, ou NPTr, cellules épithéliales de trachée) et *ex vivo* (sur PCLS, precision-cut lung slices) ont également rapporté une interférence entre ces deux infections virales, avec une diminution de la multiplication du swIAV et une atténuation de la voie de l'IFN-I lorsque le SDRPV était inoculé en même temps ou peu de temps avant l'inoculation swIAV (Dobrescu et al., 2014; Provost et al., 2017; Saade et al., 2020). Afin de disposer d'un autre modèle *in vitro* pour étudier la co/super-infection SDRPV/swIAV et évaluer son impact au niveau cellulaire, nous avons entrepris de mettre au point un système de co-culture des cellules cibles de ces deux virus, à savoir les PAM et les NPTr, respectivement, que nous avons placées en contact direct. Au cours de cette étude *in vitro*, nous avons utilisé les mêmes souches de SDRPV-1 (souche Finistère) et de swIAV H1_{hu}N2 (souche A/Sw/France/Ille et Vilaine-0415/2011) que celles utilisées au cours de notre étude *in vivo* (cf chapitre 1). Nous avons fait varier l'intervalle de temps entre les deux inoculations et avons étudié (i) les multiplications du SDRPV et du swIAV, ii) l'expression des transcrits d'IFN-I (IFN- α et - β) et iii) l'expression des gènes induits par l'interféron (RIG-I, Mx-1 et Mx-2) dans la co-culture PAM/NPTr.

Protocole et analyses

Au cours de cette étude *in vitro* sur co-culture PAM/NPTr, quatre conditions ont été étudiées : une co-inoculation SDRPV/swIAV, une mono-inoculation SDRPV, une mono-inoculation swIAV et une inoculation de milieu MEM. Les deux virus ont été inoculés à une MOI de 1, soit simultanément (SDRPV-0h-swIAV), soit à une heure d'intervalle (SDRPV-1h-swIAV). Pour la condition SDRPV-0h-swIAV, les co-cultures infectées ont été incubées pendant différents temps: 0, 12, 18, 24, 36 et 48 heures post-inoculation (hpi) avant collecte des échantillons. Pour la condition SDRPV-1h-swIAV, la cinétique a été restreinte aux temps 0, 24, 36 et 48 hpi. Les surnageants et tapis cellulaires récupérés à chaque point de cinétique ont été congelés à -80°C. Les charges génomiques des deux virus ont été mesurées par RT-qPCR (gène M pour le swIAV et ORF5 pour le SDRPV) dans les surnageants de culture. L'expression des gènes codant l'IFN- α , l'IFN- β , RIG-I, Mx-1 et Mx-2 ont été évaluées par mesure des ARNm par RT-qPCR dans les extraits des tapis cellulaires.

Publication n°2

Les deux cinétiques SDRPV-0h-swIAV et SDRPV-1h-swIAV doivent encore être consolidées et complétées, mais les résultats préliminaires sont d'ores et déjà rassemblés et présentés ici sous la forme d'un article en cours de préparation.

La doctorante a mis au point le système de co-culture NPT_r/PAM par contact direct et a réalisé l'ensemble des expériences et analyses présentées ici.

Study of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 (PRRSV-1) and swine H1N2 influenza virus co-infection in alveolar macrophages and tracheal epithelial cells co-culture model

ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and swine influenza A virus (swIAV) are both highly prevalent and enzootic in pig populations from several European countries. These two viruses are among the most important primary agents involved in porcine respiratory disease complex (PRDC), which is a major issue for pig producers worldwide. In this study, we used the newborn pig tracheal cell line (NPTr) and pulmonary alveolar macrophages (PAM) co-culture model to investigate interactions between PRRSV-1 and H1_{hu}N2 swIAV infection. The impacts of co- and super-infections were evaluated on both viral multiplications and the type I interferon (IFN-I) response. First results suggest a mutual interference between the two viral infections, as compared to single infections. The effects are dependent on the time between the two inoculations.

INTRODUCTION

Viral respiratory diseases are a major health concern in pig productions worldwide. Porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) and swine influenza A virus (swIAV) are the main pathogens of the porcine respiratory disease complex (PRDC) (Opriessnig et al., 2011). Both viruses are enzootic and highly prevalent in pig populations from several European countries (Fraile et al., 2010; Van Reeth et al., 2008), making co-infections likely to occur (Fablet et al., 2012; Fablet et al., 2011). PRRSV is an enveloped virus, belonging to the genus Betaarterivirus of the Arteriviridae family, with a 15 kilobases (kb) positive polarity single-stranded RNA genome. Two different PRRSV species, Betaarterivirus suid 1 (PRRSV-1) and Betaarterivirus suid 2 (PRRSV-2), are mostly widespread in Europe and North-America/Asia, respectively (Adams et al., 2017; Siddell et al., 2019). These viruses mainly infect pulmonary alveolar macrophages (PAM) (Lunney et al., 2016) and are known to inhibit interferon alpha (IFN- α) induction (Butler et al., 2014). The swIAV, that belongs to the genus Influenzavirus A of the Orthomyxoviridae family, is an enveloped virus with negative-sense single-stranded and segmented RNA genome (Crisci et al., 2013). The three main swIAV subtypes

encountered in pigs, i.e., H1N1, H1N2 and H3N2, circulate simultaneously in areas of high pig density with multiple region-specific genetic lineages within each subtype (Lewis et al., 2016; Watson et al., 2015). SwIAVs mainly infect epithelial cells of upper and lower respiratory tracts (Crisci et al., 2013) and are known to highly induce type I IFN (Crisci et al., 2019). Despite the frequency and importance of dual PRRSV/swIAV infections, very little is known about the outcome of co- and super-infections by PRRSV and swIAV at the molecular level. Taken together, previous *in vitro* or *ex vivo* studies indicated an interference between these two viral infections, including a decrease in swIAV multiplication and an attenuation of the IFN-I pathway, when PRRSV was inoculated simultaneously or shortly before swIAV inoculation (Dobrescu et al., 2014; Provost et al., 2017; Saade et al., 2020). Besides using precision-cut lung slices (PCLS) as a solution to bridge the gap between overly simplistic *in vitro* mono-culture cells and the dynamic biological processes that occur *in vivo*, co-culture of virus target cells could be a relevant model, easy to produce and use.

In the present study, we developed a newborn pig tracheal cell line (NPTr) and PAM co-culture model to investigate interactions between PRRSV and swIAV and the impact of co- and super-infections on both viral multiplications and antiviral response.

MATERIALS and METHODS

Cell cultures

NPTr cells were cultured in minimum essential medium (MEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and 1% of Penicillin-Streptomycin (PS), and incubated at 37°C in 5% CO₂. Sub-passages were made once to twice a week to assure the cell line maintenance.

PAM were collected by broncho-alveolar lavages from eight-week-old specific-pathogen-free piglets (SPF). These animals were obtained from the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES, Ploufragan, France). PAM were cultured at 37°C and 5% CO₂ in the same medium as NPTr cells.

Virus strains, propagations and titrations

The PRRSV-1 subtype 1 Finistere strain, referenced as PRRS-FR-2005-29-24-1 (GenBank accession No. KY366411) was isolated in 2005 from a sow with reproductive failures in a herd located in Brittany, France. Infectious particles of PRRSV-1 were propagated and

titrated on PAM collected from SPF piglets for six passages. Virus titers were calculated using the Karber method (Kärber, 1931).

The swIAV strain A/Sw/France/Ille et Vilaine-0415/2011 of H1_{hu}N2 subtype (Genbank accession No. KR699787-94) was isolated from nasal swabs taken from a pig with acute respiratory disease during an outbreak in a herd located in Brittany, France. Infectious particles of swIAV H1_{hu}N2 were propagated and titrated on Madin-Darbin canine kidney (MDCK) cells for five passages. Virus titers were calculated using the Reed and Muench method (Reed and Muench, 1938).

These two viruses were purified and concentrated using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit – pore size 100 kDa (Merck, Burlington, Massachusetts, USA). Thereafter, the PRRSV-1 and the swIAV H1_{hu}N2 virus stocks reached titers of $10^{7.80}$ TCID₅₀/ml and $10^{7.35}$ TCID₅₀/ml, respectively.

NPTr-PAM co-culture and virus infections

NPTr cells were seeded in 24-well plates at 3×10^5 cells per well and cultured at 37°C and 5% CO₂ for 24 h to reach 100 % confluence. After one wash with 1 ml of MEM, PAM were added to the culture at 1.2×10^6 cells per well and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 h to promote their adherence on NPTr cells.

Series of three wells of NPTr-PAM co-cultures were single-, co- or super-infected with PRRSV-1 and swIAV (H1_{hu}N2) at a multiplicity of infection (MOI) of 1. Additionally, three non-infected wells were used as controls.

For co-infection conditions (PRRSV-0h-swIAV), NPTr-PAM co-cultures were simultaneously infected with PRRSV-1 and swIAV. Virus attachment was allowed for 1 h at 37°C, 5% CO₂, with rocking agitation. Thereafter, the co-culture cells were washed with 1 ml of MEM and maintained at 37°C, 5% CO₂ in 1 ml of MEM supplemented with 10% of FBS and 1% of PS. At 0, 12, 18, 24, 36 and 48 h post infection (hpi), cell supernatants were removed and stored at -80 °C. The cell layers were washed with 1 ml of sterile phosphate buffered saline (PBS), lysed with 300 µL of lysis buffer of the NucleoSpin 8 RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and stored at -80 °C.

For super-infected conditions, NPTr-PAM co-cultures were first infected with PRRSV-1 and, after a wash with 1 ml of MEM, super-infected with swIAV one hour later (PRRSV-1h-swIAV). Cell supernatants and cell layers were collected at 0, 24, 36 and 48 hpi swIAV in the same way as for co-infection condition.

Cell viability assay

At 0, 24, 36 and 48 hpi, in a 96-well plates, series of three wells of NPTr-PAM co-cultures (same cells ratio as in the 24-well plates) single-, co-, super-infected or controls containing a final volume of 100 μ L per well were added with 15 μ L of dye solution of CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Each plates were then incubated for 1 h at 37 °C, 5 % CO₂. Living cells converted the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) tetrazolium component of the dye solution into a formazan product proportionally to the number of viable cells. Then, 100 μ L of stop solution was added to each well to solubilize the formazan product. The absorbance of each well was recorded at 550 nm. The cell viability was plotted as optical density.

Quantifications of PRRSV and swIAV genomic loads

PRRSV-1 genome was quantified in cell supernatants. Viral RNA was extracted by the KingFisher™ Flex automated extraction robot (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) using the ID Gene® Mag Fast Extraction kit (IDvet, Grabel, France). The detection and quantification of PRRSV-1 Finistere strain was performed by duplex reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) using the SuperScript III platinum one-step RT-qPCR kit (Life Technologie, Carlsbad, CA, USA) with primers and probes specific to ORF5 and β -actin gene as previously described (Renson et al., 2017). Results were quantified by relative quantification using the $\Delta\Delta$ Ct method and expressed in log₂ R (relative amount $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$), as previously described (Charpin et al., 2012).

SwIAV genome was also quantified in cell supernatants and swIAV RNA was extracted using the same protocol as for PRRSV-1 RNA. The detection and quantification of swIAV (H1_{hu}N2) was performed by duplex M gene / β -actin gene RT-qPCR using Go Script RT mix for 1 Step RT-qPCR (Promega, Madison, Wisconsin, USA), as previously described (Cador et al., 2016). SwIAV genome quantification was obtained by using serial dilutions of standardized β -actin and M mRNA. Results were expressed as copy number of M gene/10⁶ copies of β -actin gene.

Interferon and interferon-stimulating gene (ISG) expression measurement

Total RNA was isolated from cell layers by using the NucleoSpin 8 RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). A treatment with DNase I was realized during the extraction according to the manufacturer's instruction. RNA concentration was quantified using the Quant-it RNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), and determined by

using Spectrophotometer (TECAN, Männedorf, Zürich, Switzerland). Gene expression was assessed with the GoTaq®1-Step RT-qPCR system (Promega, Madison, Wisconsin, USA) from 50 to 150 ng of RNA per reaction. The RT-PCR conditions were: 45 °C for 15 min, 95 °C for 10 min, 40 cycles each of 95 °C at 10 s, 30 s at the appropriated annealing temperature (**table 1**) and 30 s at 72 °C. The specificity of the RT-PCR reactions was assessed by analyzing the melting curves of the generated products. Samples were normalized internally simultaneously using the average cycle quantification of three reference genes in each sample (Beta-2-microglobulin (B2MI), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPTR-1)). Results were expressed as relative expressions of target genes, using the $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ equation with regard to the mean expression level in controls collected at the respective time point.

Table 1: Primer sequences, annealing temperatures of primer sets (°C), amplicon Size (bp) and accession numbers or references

Primer name	Primer Sequences Sense (S); Anti-Sense (AS)	Annealing Temperature	Amplicon size	Accession Number or reference
(1) Reference genes				
B2MI <i>Beta-2-microglobulin</i>	(S) CAAGATAGTTAAGTGGGATCGAGAC (AS) TGGTAACATCAATACGATTCTGA	58	161	(Nygard et al., 2007)
GAPDH <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	(S) CTTACGACCATGGAGAAGG (AS) CCAAGCAGTTGGTGGTACAG	63	170	AF017079
HPRT1 <i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>	(S) GGA CT TGAATCATGTTTGTG (AS) CAGATGTTTCCAAACTCAAC	60	91	(Nygard et al., 2007)
(2) Interferons				
IFN-α <i>Interferon alpha</i>	(S) GGCTCTGGTGCATGAGATGC (AS) CAGCCAGGATGGAGTCCTCC	62	197	JQ839262.1
IFN-β <i>Interferon beta</i>	(S) GGCTCTGGTGCATGAGATGC (AS) CAGCCAGGATGGAGTCCTCC	62	70	(Razzuoli et al., 2011)
(3) Interferon-induced genes				
RIG-I <i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>	(S) CGACATTGCTCAGTGCAATC (AS) TCAGCGTTAGCAGTCAGAAG	60	126	NM-213804
MX1 <i>Myxovirus resistance protein 1</i>	(S) AGTGTCGGCTGTTTACCAAG (AS) TTCACAAACCCTGGCAACTC	60	151	NM-214061
MX2 <i>Myxovirus resistance protein 2</i>	(S) CCGACTTCAGTTCAGGATGG (AS) ACAGGAGACGGTCCGTTTAC	62	156	AB258432

Statistical analysis

Data were analyzed by using non-parametric Kruskal-Wallis test with Holm's corrected pairwise comparisons to study difference between groups. All statistical analyses were performed by using R software (version 3.1.3), and significant differences were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

SwIAV co/super infection prevents the decrease of cell viability related to PRRSV infection

The cell viability in the NPTr/PAM co-culture was measured by using MTT assay on all inoculated and control samples (**figure 1**).

Compare to Control samples, increase in cell viability was observed in swIAV-infected samples in both series of experiments, i.e. PRRSV-0h-swIAV (**figure 1A**) and PRRSV-1h-swIAV (**figure 1B**) conditions. By contrast, a lower apparent cell viability was noticed in PRRSV-infected samples, that was statistically significant at 36 hpi in PRRSV-0h-swIAV condition as compared to Control samples (**figure 1A**).

Cell viability in co- (PRRSV-0h-swIAV) or super- (PRRSV-1h-swIAV) infected samples was not different from that measured in swIAV-infected samples in both series of experiments (**figure 1A and 1B**). However, it was significantly higher in co- or super-infected conditions than in PRRSV-infected samples at 36 hpi (**figure 1A and 1B**).

Finally, in both studied conditions, a cytopathic effect on PAM was observed in all infected samples, with a stronger effect in PRRSV-infected ones at 36 hpi, compared to Control samples (**data not shown**). No cytopathic effect on NPTr cells was observed in all inoculated samples.

Cell viability

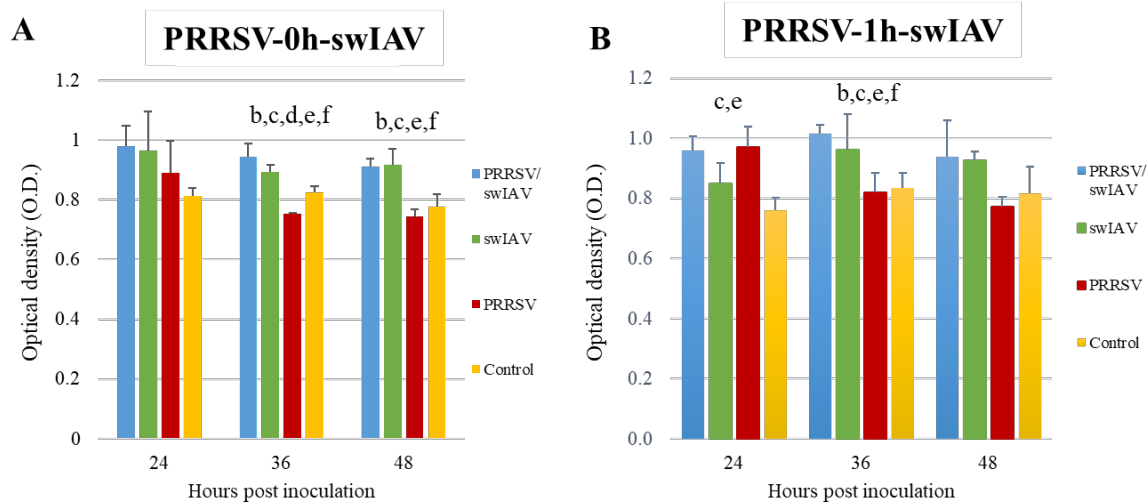


Figure 1: Cell viability assessment in NPTr/PAM co-culture after swIAV, PRRSV or co-infection. **A)** PRRSV-0h-swIAV condition. **B)** PRRSV-1h-swIAV condition. All data are reported as the mean (\pm standard deviation) of results obtained from samples ($n=3$) in PRRSV/swIAV co or super-infected samples (blue), PRRSV single infected samples (red), swIAV single infected samples (green) and control samples (yellow). Letters indicate that significant differences (with $p < 0.05$) were obtained between PRRSV/swIAV and (a) swIAV or (b) PRRSV or (c) Control samples, (d) and (e) significant difference between PRRSV or swIAV and Control samples (respectively) and (f) between swIAV and PRRSV.

PRRSV/swIAV co- or super-infection altered both PRRSV and swIAV multiplications in NPTr/PAM co-cultures

PRRSV and swIAV multiplications were monitored in co-culture supernatants from all inoculated samples by RT-qPCR (**figure 2**). No swIAV or PRRSV genome was detected in Control samples (**data not shown**).

Under PRRSV-0h-swIAV condition, swIAV genomic load was significantly reduced throughout the monitoring kinetic in PRRSV/swIAV co-infected samples compared to swIAV-infected samples (**figure 2A**). Similarly, PRRSV genomic load was lower at 18 and 36 hpi in PRRSV/swIAV co-infected samples compared to PRRSV infected samples (**figure 2B**). Under PRRSV-1h-swIAV condition, PRRSV and swIAV multiplications measured at 24 hpi in PRRSV/swIAV samples were significantly lower than those measured in single-infected samples at this time-point (**figure 2C and 2D**).

Viral multiplication

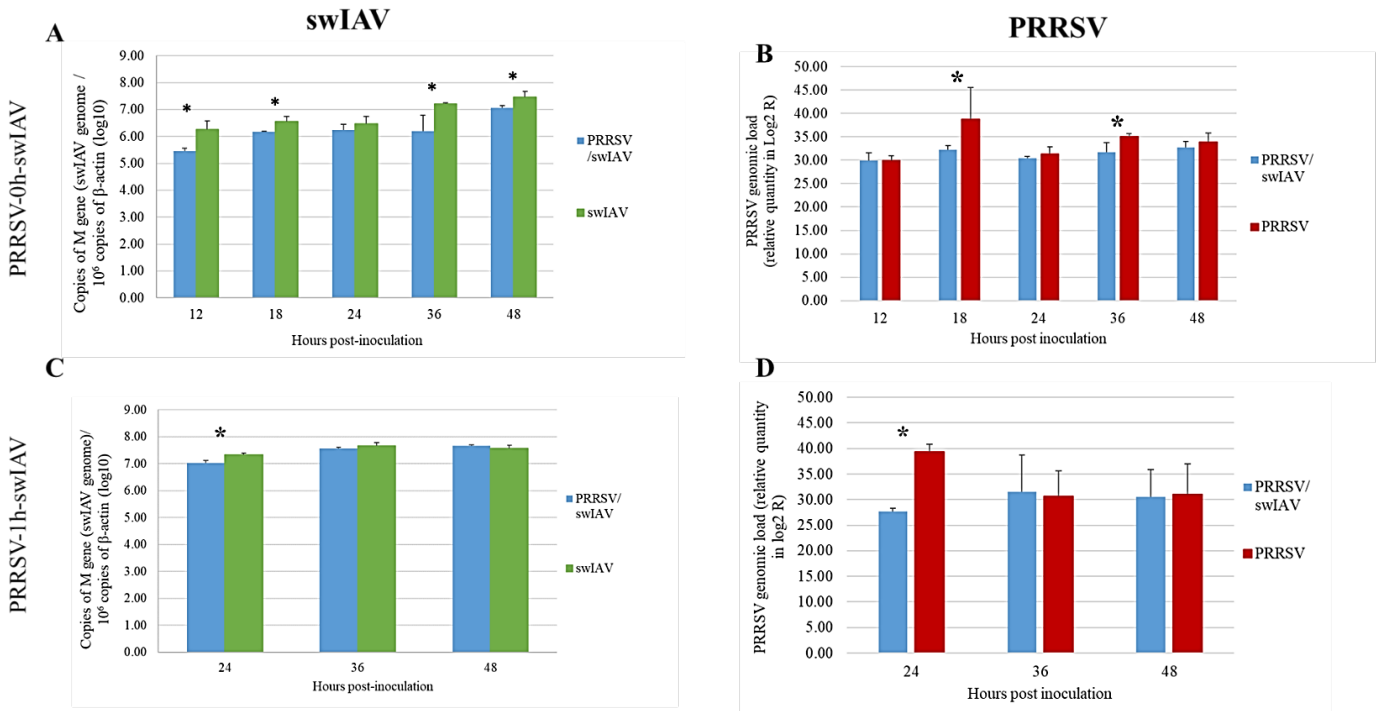


Figure 2: PRRSV or swIAV genomic load in cell supernatants from infected samples. A) and C) swIAV genomic load. B) and D) PRRSV genomic load. Top: PRRSV-0h-swIAV condition. Down: PRRSV-1h-swIAV condition. All data are reported as the mean (\pm standard deviation) of results obtained from samples ($n=3$) in PRRSV/swIAV co- or super-infected samples (blue), PRRSV single infection samples (red), swIAV single infection samples (green). *: $p < 0.05$.

PRRSV/swIAV co- or super-infection altered antiviral response

Expressions of IFN-I (IFN- α and - β) genes and ISG (RIG-I, Mx1 and Mx2) were monitored in cell layers from all inoculated samples by RT-qPCR (**figure 3**).

A very low, or even no, IFN- α gene expression was observed in single-infected samples, in both studied conditions (**figure 3A_a** and **3A_b**). Under PRRSV-0h-swIAV condition, a significant up-regulation of IFN- α gene expression was reported at 36 hpi in co-infected samples, compared to single-infected ones (**figure 3A_a**). In PRRSV-1h-swIAV condition, such a significant difference between super- and single-infected samples was not measured (**figure 3A_b**).

A slight induction of IFN- β gene was observed in PRRSV-infected samples at 24 hpi, compared to swIAV-infected samples, in both studied conditions (**figure 3B_a** and **3B_b**). Under PRRSV-0h-swIAV condition, a strong up-regulation of IFN- β gene expression was measured at 24 hpi in co-infected samples, compared to single-infected ones (**figure 3B_a**). In PRRSV-1h-swIAV condition, this up-regulation of IFN- β gene expression in super-infected

samples was less pronounced, but significantly higher than in single-infected samples at 24 hpi (**figure 3B_b**).

PRRSV infection did not increase RIG-I expression, while swIAV infection was able to induce this gene significantly (**figure 3C_a and 3C_b**). In PRRSV-0h-swIAV co-infected samples, RIG-I expression was significantly higher than in PRRSV-infected samples from 36 hpi, but it was found to be lower than in swIAV-infected ones at 48 hpi (**figure 3C_a**). In PRRSV-1h-swIAV, RIG-I expression in super-infected samples was significantly lower than in swIAV infected ones at 36 hpi (**figure 3C_b**).

Mx1 gene expression was stronger in swIAV-infected samples at 36 hpi, compared to PRRSV-infected samples, in both series of experiments (**figure 3D_a and 3D_b**). At that time, Mx1 gene expression was up-regulated in PRRSV-0h-swIAV compared to both single-infected ones (**figure 3D_a**). By contrast, this gene was less induced in PRRSV-1h-swIAV super-infected samples at 24 and 36 hpi, compared to swIAV-infected samples, while it was still found more abundant than in PRRSV-infected samples at 36 and 48 hpi (**figure 3D_b**).

Mx2 gene expression was upregulated in swIAV-infected samples at 48 hpi, compared to PRRSV-infected ones in PRRSV-0h-swIAV (**figure 3E_a**) and at 36 and 48 hpi in PRRSV-1h-swIAV (**figure 3E_b**). In PRRSV-0h-swIAV condition, there was no significant difference between co-infected and swIAV-infected samples until 36 hpi (**figure 3E_a**). At 48 hpi, Mx2 expression was reduced in co-infected samples, compared to swIAV infected ones. In PRRSV-1h-swIAV condition, Mx2 expression was downregulated in super-infected samples as compared to swIAV infected ones, as early as 24 hpi, but no more significant difference between super- and swIAV-infected samples was observed at 48 hpi (**figure 3E_b**). Despite downregulation as compared to swIAV-infected samples, Mx2 expression in co- and super-infected samples was still found higher than in PRRSV-infected ones at 24 and 36 hpi.

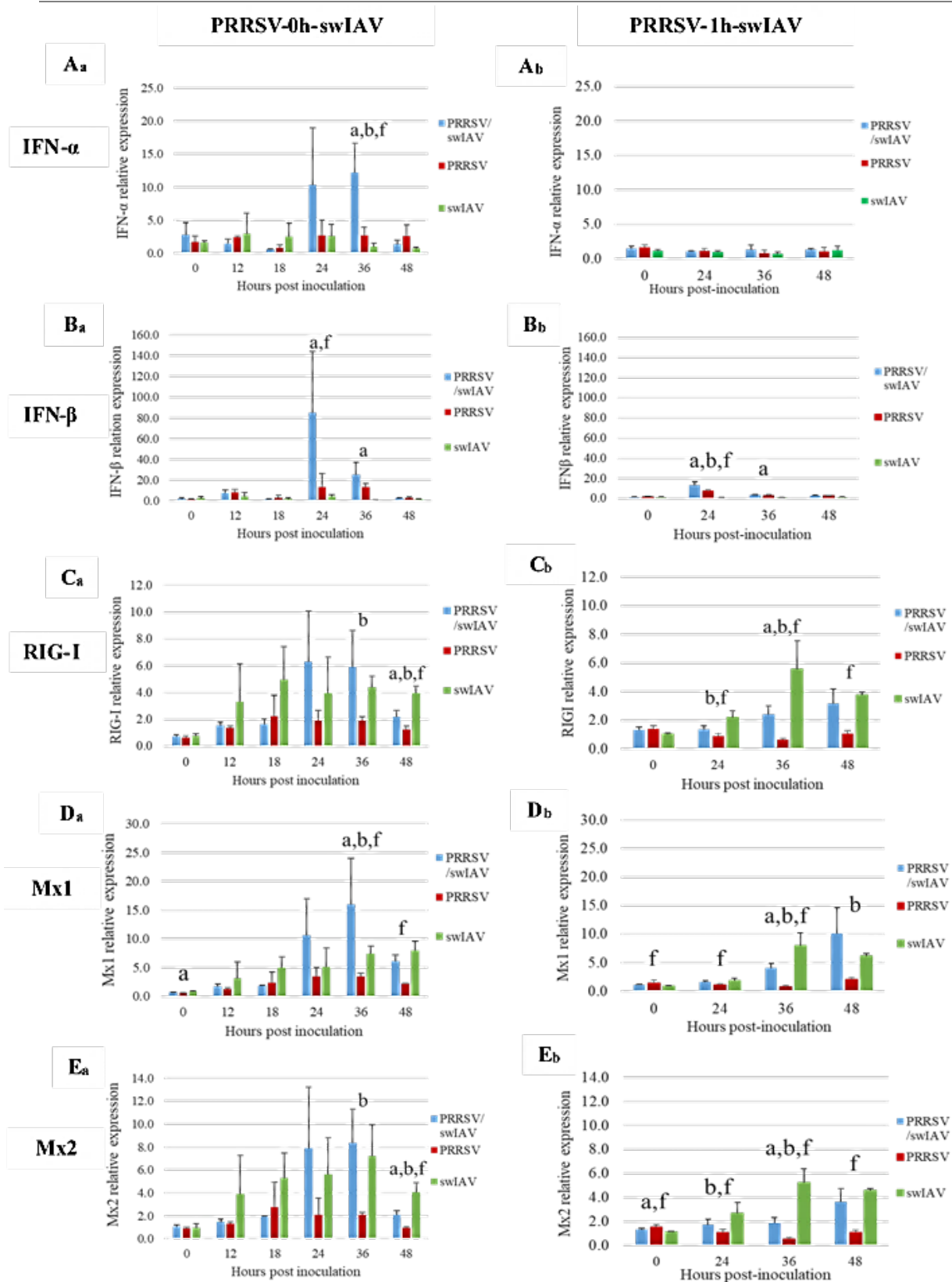


Figure 3: Relative expression of interferons and ISG in cell layers from infected samples. Left: PRRSV-0h-swIAV condition. Right: PRRSV-1h-swIAV condition. A) IFN- α ; B) IFN- β ; C) RIG-I; D) Mx1; E) Mx2 relative expressions. All data reported as the mean (\pm standard deviation) or results obtained from samples (n=3) in PRRSV/swIAV co or super-infected samples (blue), PRRSV single infection samples (red), swIAV single infection samples (green). *: $p < 0.05$. Letters indicate that significant differences (with $p < 0.05$) were obtained between PRRSV/swIAV and (a) swIAV or (b) PRRSV and between swIAV and (f) PRRSV.

DISCUSSION

In this preliminary study, we investigated the possible interference between PRRSV and swIAV in a co-culture model involving NPTr and PAM, by studying the impact of a co- or super-infection on both viral multiplications and the antiviral response.

Concerning NPTr/PAM co-culture cell viability, we noticed a strong cytopathic effect on PAM, unlike NPTr, upon PRRSV single-infection, associated with a lower apparent cell viability, compared to co- and super- infected conditions. In addition, no difference in cell viability between co-, super- and swIAV-infected co-culture cells was reported. This result is inconsistent with Saade et al., who showed that cell viability of NPTr cells infected by swIAV (H1N2), assessed by impedance measurement, was completely abolished, compared to PRRSV/swIAV and PRRSV-infected cells (Saade et al., 2020). Knowing that MTT assay is based on measurement of an enzymatic activity and that swIAV infection can activate cellular metabolisms (Sanchez and Lagunoff, 2015), it would seem necessary to confirm our results with a method not based on MTT assay, such as the impedance measurement.

Regarding viral multiplications, high PRRSV-1 and swIAV (H1N2) genomic loads were measured in single-infected NPTr/PAM co-cultures, as previously reported in studies using PAM or NPTr only, respectively (Provost et al., 2017; Saade et al., 2020), reflecting the capacity of both viruses to replicate in the co-culture system. By contrast, PRRSV replication was reduced in PRRSV/swIAV co- or super-infected cells, indicating an interference of swIAV in PRRSV infection. This is in accordance with a previous study conducted in NPTr-CD163 cells (Provost et al., 2017). Interestingly, this lower PRRSV replication in PRRSV/swIAV co- or super-infected cells could also explain the maintenance of the apparent cell viability in these samples, compared to PRRSV infected samples. A lower swIAV genomic load was also observed in PRRSV/swIAV co- and super-infected samples, as compared to swIAV single-infected ones, in consistence with another study on PRRSV/swIAV co- and super-infection using NPTr cells (Saade et al., 2020). We know that PRRSV and swIAV mainly target alveolar macrophages and epithelial cells, respectively (Crisci et al., 2019). However, recent studies showed that swIAV could also infect pulmonary macrophages (Meischel et al., 2020). One possible explanation for this mutual interaction on viral multiplications might be the blockage or steric hindrance of cellular receptors by the first interacting virus, resulting in lower viral multiplication, as previously observed in another *in vitro* model of co-infection between swIAV and PRCoV in PCLS and NPTr cells (Krimmling and Schwegmann-Wessels, 2017). This assumption should be verified by specific swIAV and

PRRSV staining to determine the proportions of cells infected by each virus, or co-infected. Furthermore, innate immune responses could influence virus replications and may lead to a reduction in viral multiplication after co- or super-infection. Indeed, we know that PRRSV is sensitive to IFN- α antiviral effect (Albina et al., 1998) and swIAV highly induces type I IFN (Crisci et al., 2019). Analysis of IFN-I (IFN- α and IFN- β), RIG-I, Mx-1 and Mx-2 encoding gene expressions, highlighted their higher upregulation in PRRSV/swIAV co- and/or super-infected samples, compared to PRRSV infected samples. Therefore, the impact swIAV infection had on PRRSV multiplication was probably linked to the induction of IFN-I during PRRSV/swIAV co- and super-infection.

Regarding antiviral response, IFN- α and IFN- β genes were only slightly induced between 12 and 48 hpi in swIAV-infected samples, as compared to co- (PRRSV-0h-swIAV) or super- (PRRSV-1h-swIAV) infected samples. This result was quite surprising as swIAV is known to be a strong inducer of IFN-I (Crisci et al., 2019). One explanation could be that IFN-I induction might have occurred between 0 and 12 hours after swIAV inoculation, as induction of ISG expression (RIG-I, Mx1 and Mx2) was measured as early as from 12 hpi in swIAV infected samples. To confirm this hypothesis, further analyses including very early time points (3, 6 and 9 hours) after swIAV inoculation should be performed. In addition, an overexpression of IFN- β upon PRRSV single infection was observed, as previously reported in PAM (Genini et al., 2008) or PCLS (Dobrescu et al., 2014). Compared to swIAV-infected samples, ISG were mostly equivalent in their expression at 24-36 hpi after PRRSV/swIAV co-infection, as previously observed in other studies using single infected cells or PCLS (Dobrescu et al., 2014; Provost et al., 2017) and then, this ISG expression decreased at 48 hpi. As PRRSV is deemed to block IFN- α induction (Du et al., 2017), the simultaneous infection might have slightly delayed IFN- α blocking by PRRSV. Under PRRSV-1h-swIAV condition, no difference in IFN- α expression was observed between PRRSV/swIAV super-infected samples and single-infected ones, as previously reported by Provost et al., during a super-infection implemented on PCLS in the condition PRRSV-3h-swIAV (Provost et al., 2017). Inductions of RIG-I, Mx-1 and Mx-2 were lower than in swIAV single infected samples, as previously observed (Saade et al., 2020). These results, which are different from those obtained when both viruses were inoculated at the same time, would indicate that the one-hour delay between both inoculations might have allowed the PRRSV infection to block the interferon pathway usually induced by swIAV.

Such data need to be confirmed in repeated experiments, but our first results in NTPr/PAM co-culture suggest a mutual interference in both viral multiplications and a time-dependent impact of PRRSV/swIAV infection on the antiviral response, as previously reported in studies using PAM, NTPr or PCLS (Dobrescu et al., 2014; Provost et al., 2017; Saade et al., 2020). Based on these first results, this co-culture system appears to be a relevant model to study PRRSV/swIAV co-infection, despite the fact that this co-culture system does not reflect the lung tissue as well as PCLS. Moreover, it would be interesting to develop an indirect contact co-infection model, using transwell membranes to see if there is a concordance between these two co-culture systems and to know if these viral interactions were operated via cellular factors released following the viral infections.

REFERENCES

- Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Harrach, B., Harrison, R.L., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Mushegian, A.R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M., Gorbalenya, A.E., Davison, A.J., 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch Virol* 162, 2505-2538.
- 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 : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 18, 485-490.
- 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, 81-108.
- Cador, C., Hervé, S., Andraud, M., Gorin, S., Paboeuf, F., Barbier, N., Quéguiner, S., Deblanc, C., Simon, G., Rose, N., 2016. Maternally-derived antibodies do not prevent transmission of swine influenza A virus between pigs. *Veterinary research* 47, 86.
- Charpin, C., Mahé, S., Keranflec'h, A., Belloc, C., Cariolet, R., Le Potier, M.F., Rose, N., 2012. Infectiousness of pigs infected by the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is time-dependent. *Veterinary research* 43, 69.
- Crisci, E., Fraile, L., Montoya, M., 2019. Cellular Innate Immunity against PRRSV and Swine Influenza Viruses. *Vet Sci* 6.
- Crisci, E., Mussa, T., Fraile, L., Montoya, M., 2013. Review: influenza virus in pigs. *Mol Immunol* 55, 200-211.
- Dobrescu, I., Levast, B., Lai, K., Delgado-Ortega, M., Walker, S., Banman, S., Townsend, H., Simon, G., Zhou, Y., Gerds, V., Meurens, F., 2014. In vitro and ex vivo analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Veterinary microbiology* 169, 18-32.
- Du, T., Nan, Y., Xiao, S., Zhao, Q., Zhou, E.M., 2017. Antiviral Strategies against PRRSV Infection. *Trends in Microbiology* 25, 968-979.
- Fablet, C., Marois-Créhan, C., Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N., 2012. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: a cross-sectional study. *Veterinary microbiology* 157, 152-163.
- Fablet, C., Marois, C., Kuntz-Simon, G., Rose, N., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J.P., Le Devendec, L., Tocqueville, V., Queguiner, S., Gorin, S., Kobisch, M., Madec, F., 2011. Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Veterinary microbiology* 147, 329-339.
- Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarías, M., Segalés, J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 184, 326-333.

- Genini, S., Delputte, P.L., Malinverni, R., Cecere, M., Stella, A., Nauwynck, H.J., Giuffra, E., 2008. Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Journal of general virology* 89, 2550-2564.
- Kärber, G., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 162, 480-483.
- Krimmling, T., Schwegmann-Wessels, C., 2017. Comparison of mono- and co-infection by swine influenza A viruses and porcine respiratory coronavirus in porcine precision-cut lung slices. *Research in veterinary science* 115, 470-477.
- Lewis, N.S., Russell, C.A., Langat, P., Anderson, T.K., Berger, K., Bielejec, F., Burke, D.F., Dudas, G., Fonville, J.M., Fouchier, R.A., Kellam, P., Koel, B.F., Lemey, P., Nguyen, T., Nuansrichy, B., Peiris, J.M., Saito, T., Simon, G., Skepner, E., Takemae, N., Webby, R.J., Van Reeth, K., Brookes, S.M., Larsen, L., Watson, S.J., Brown, I.H., Vincent, A.L., 2016. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. *eLife* 5, e12217.
- 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, 129-154.
- Meischel, T., Villalon-Letelier, F., Saunders, P.M., Reading, P.C., Londrigan, S.L., 2020. Influenza A virus interactions with macrophages: Lessons from epithelial cells. *Cell Microbiol* 22, e13170.
- Nygaard, A.B., Jørgensen, C.B., Cirera, S., Fredholm, M., 2007. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC molecular biology* 8, 67.
- Opriessnig, T., Gimenez-Lirola, L.G., Halbur, P.G., 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev* 12, 133-148.
- Provost, C., Hamonic, G., Gagnon, C.A., Meurens, F., 2017. Dual infections of CD163 expressing NPTr epithelial cells with influenza A virus and PRRSV. *Veterinary microbiology* 207, 143-148.
- Razzuoli, E., Villa, R., Sossi, E., Amadori, M., 2011. Reverse transcription real-time PCR for detection of porcine interferon α and β genes. *Scandinavian journal of immunology* 74, 412-418.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *American Journal of Epidemiology* 27, 493-497.
- Renson, P., Rose, N., Le Dimna, M., Mahe, S., Keranflec'h, A., Paboeuf, F., Belloc, C., Le Potier, M.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, 15.
- Saade, G., Menard, D., Hervet, C., Renson, P., Hue, E., Zhu, J., Dubreil, L., Paillot, R., Pronost, S., Bourry, O., Simon, G., Dupont, J., Bertho, N., Meurens, F., 2020. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Interferes with Swine Influenza A Virus Infection of Epithelial Cells. *Vaccines* 8.
- Sanchez, E.L., Lagunoff, M., 2015. Viral activation of cellular metabolism. *Virology* 479-480, 609-618.
- Siddell, S.G., Walker, P.J., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Adams, M.J., Dutilh, B.E., Gorbalenya, A.E., Harrach, B., Harrison, R.L., Junglen, S., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Nibert, M., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M., Davison, A.J., 2019. Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018). *Arch Virol* 164, 943-946.
- Van Reeth, K., Brown, I.H., Dürrwald, R., Foni, E., Labarque, G., Lenihan, P., Maldonado, J., Markowska-Daniel, I., Pensaert, M., Pospisil, Z., Koch, G., 2008. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. *Influenza and other respiratory viruses* 2, 99-105.
- Watson, S.J., Langat, P., Reid, S.M., Lam, T.T., Cotten, M., Kelly, M., Van Reeth, K., Qiu, Y., Simon, G., Bonin, E., Foni, E., Chiapponi, C., Larsen, L., Hjulsager, C., Markowska-Daniel, I., Urbaniak, K., Dürrwald, R., Schlegel, M., Huovilainen, A., Davidson, I., Dán, Á., Loeffen, W., Edwards, S., Bublot, M., Vila, T., Maldonado, J., Valls, L., Brown, I.H., Pybus, O.G., Kellam, P., 2015. Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J Virol* 89, 9920-9931.

Conclusion

Les résultats préliminaires de cette étude *in vitro* visant à étudier l'impact de la co-infection SDRPV/swIAV dans un système de co-culture NPT_r/PAM, suggèrent une interférence bidirectionnelle entre ces deux virus à tropisme respiratoire, ce qui semble aller dans le même sens que les résultats de notre étude *in vivo* (chapitre 1). Cette interférence virale diminue à la fois la multiplication du SDRPV-1 et du swIAV (H1_{hu}N2) et l'impact sur la voie de l'interféron est dépendant de l'intervalle de temps entre les deux inoculations virales. En effet, lors d'une co-infection simultanée (condition SDRPV-0h-swIAV), nous avons observé un léger retard dans l'induction des mécanismes de blocage de la voie de l'interféron par l'infection PRRSV. Dans notre condition de super-infection SDRPV-1h-swIAV, l'heure de délai entre les deux inoculations a semble-t-il permis au SDRPV de mettre en place son système de blocage de l'IFN- α avant que celui-ci ne soit induit fortement par le swIAV.

Afin de confirmer ces résultats, il conviendra de répéter les deux conditions expérimentales déjà testées. Nous avons également essayé la condition de co-infection swIAV-1h-SDRPV mais les premiers résultats obtenus n'ont pas été concluants. Il serait cependant intéressant de renouveler la cinétique dans cette condition afin de compléter les données. En effet, cette condition de super-infection permettrait de connaître l'effet d'une primo-infection swIAV sur l'infection subséquente SDRPV, et de savoir si le SDRPV peut ou non bloquer la réponse IFN-I dans ce cas. D'autre part, il serait intéressant de développer un modèle de co-infection en contact indirect, via l'utilisation de membranes transwell. Dans ce modèle de co-culture en contact indirect, les communications intercellulaires ne pourront se faire que par des cytokines ou d'autres facteurs solubles, ce qui permettrait de savoir si l'interaction virale, si elle a également lieu dans ce contexte, est opérée via des facteurs cellulaires libérés suite aux infections virales.

CHAPITRE 3

Impact d'une infection concomitante par un swIAV sur la vaccination des porcelets contre le SDRP à l'aide d'un vaccin vivant atténué

Introduction

Afin de diminuer les conséquences cliniques de l'infection par le SDRPV, certaines mesures de maîtrises, telles que la vaccination, sont fréquemment mises en place sur le terrain. Dans notre laboratoire et dans d'autres équipes, des études en conditions expérimentales ont mis en évidence une très bonne efficacité des MLV avec une réduction importante de la transmission du SDRPV chez les porcs en croissance (Pileri et al., 2015; Rose et al., 2015). Néanmoins, l'efficacité de la vaccination anti-SDRPV est plus limitée sur le terrain. Cette diminution d'efficacité vaccinale pourrait d'une part être liée à l'interférence des AOM (Fablet et al., 2016b; Renson et al., 2019), mais pas uniquement. En effet, il a été montré au laboratoire que l'induction d'IFN- α pouvait également affecter l'efficacité d'un MLV-1 sur le terrain (Renson et al., 2019). D'autre part, Brockmeier et al., ont observé que l'IFN- α était capable d'inhiber complètement la multiplication d'un MLV-2 ainsi que l'induction de la réponse immunitaire post-vaccinale associée chez des porcelets simultanément infectés par un Ad5-IFN- α induisant la production d'IFN- α (Brockmeier et al., 2017). Comme observé dans notre étude de co-infection SDRPV/swIAV (Cf chapitre 1), le swIAV (H1_{hu}N2) est capable d'induire de fortes quantités d'IFN- α . Par ailleurs, chez les animaux en croissance, les MLV sont généralement administrés aux porcelets au moment du sevrage (3 ou 4 semaines d'âge), période à laquelle peuvent survenir des infections swIAV.

Suite à ces constats, il semblait particulièrement pertinent d'étudier l'interaction possible entre l'infection par le swIAV et la vaccination MLV-1 chez le porcelet. Par conséquent, nous avons étudié l'effet de l'infection swIAV H1_{hu}N2 sur (i) la multiplication d'un MLV-1, (ii) la réponse immunitaire post-vaccinale et (iii) l'efficacité de la vaccination MLV-1 vis-à-vis d'une épreuve virulente par la souche SDRPV-1 Finistère, également utilisée au cours de l'étude de co-infection SRPV/swIAV (chapitre 1).

Protocole expérimental et analyses

Vingt-quatre porcelets EOPS âgés de 5 semaines d'âge ont été répartis en quatre groupes de six animaux chacun :

- Un groupe inoculé swIAV (H1_{hu}N2, souche A/Sw/Ile et Vilaine/0415/2011, 10⁶TCID₅₀, voie trachéale), vacciné MLV-1 (Porcilis PRRS, voie intramusculaire) six heures après, et challengé SDRPV-1 un mois plus tard (souche Finistère, 5x10⁵ TCID₅₀, voie intranasale) (groupe SIVAC)
- Un groupe vacciné MLV-1 puis challengé SDRPV-1 un mois plus tard (groupe VAC)

- Un groupe non vacciné puis challengé SDRPV-1 un mois plus tard (groupe UNVAC)
- Un groupe non vacciné et non challengé (groupe CTRL).

La température rectale et le score clinique des porcelets ont été mesurés quotidiennement et le gain moyen quotidien de façon hebdomadaire. Des prélèvements de sérum, de sang sur héparine pour isoler les PBMC, des BAL, ainsi que des écouvillons nasaux ont été effectués. Les animaux ont été euthanasiés entre J70 et J73 post-vaccination. Les charges génomiques du MLV-1, du SDRPV-1 et du swIAV ont été mesurées par RT-qPCR (ORF7, ORF5 et gène M, respectivement). Les anticorps dirigés contre le SDRPV-1 et le swIAV ainsi que les niveaux d'IFN- α ont été mesurés sur les matrices sérum et surnageant de BAL par ELISA. L'expression des gènes d'IL-10 et d'IFN- γ ont été quantifiées par RT-PCR sur les cellules de BAL. La réponse immunitaire à médiation cellulaire spécifique du MLV-1 et du SDRPV-1 a été analysée par ELISPOT IFN- γ sur des PBMC et des cellules de BAL.




Publication n°3

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'un article publié en 2021 dans la revue *Vaccines* et intitulé « **Concomitant Swine Influenza A Virus Infection Alters PRRSV1 MLV Viremia in Piglets but Does Not Interfere with Vaccine Protection in Experimental Conditions** ».

L'essai expérimental a été réalisé par l'équipe du laboratoire avant le démarrage de cette thèse, mais la doctorante a réalisé une partie des analyses ELISA IgG anti-swIAV et des RT-qPCR sur BALC de cet essai expérimental. Elle a contribué à l'analyse des résultats, ainsi qu'à la rédaction de l'article.

Article

Concomitant Swine Influenza A Virus Infection Alters PRRSV1 MLV Viremia in Piglets but Does Not Interfere with Vaccine Protection in Experimental Conditions

Patricia Renson ^{1,*}, Céline Deblanc ¹, Juliette Bougon ^{1,2}, Mireille Le Dimna ¹, Stéphane Gorin ¹, Sophie Mahé ¹, Nicolas Barbier ¹, Frédéric Paboef ³, Gaëlle Simon ¹ and Olivier Bourry ¹

¹ Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses), Unité Virologie Immunologie Porcines, BP 53, 22440 Ploufragan, France; celine.deblanc@anses.fr (C.D.); juliette.bougon@anses.fr (J.B.); mireille.ledimna@anses.fr (M.L.D.); stephane.gorin@anses.fr (S.G.); sophie.mahe@anses.fr (S.M.); nicolas.barbier@anses.fr (N.B.); gaelle.simon@anses.fr (G.S.); olivier.bourry@anses.fr (O.B.)

² Université de Rennes (UNIR), Cité Internationale, 1 Place Paul Ricoeur, CS 54417, 35044 Rennes, France

³ Anses, Service de Production de Porcs Assainis et d'Expérimentation, BP 53, 22440 Ploufragan, France; frederic.paboef@anses.fr

* Correspondence: patricia.renson@anses.fr; Tel.: +33-296-016-450



Citation: Renson, P.; Deblanc, C.; Bougon, J.; Le Dimna, M.; Gorin, S.; Mahé, S.; Barbier, N.; Paboef, F.; Simon, G.; Bourry, O. Concomitant Swine Influenza A Virus Infection Alters PRRSV1 MLV Viremia in Piglets but Does Not Interfere with Vaccine Protection in Experimental Conditions. *Vaccines* **2021**, *9*, 356. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040356>

Academic Editor: Ralph A. Tripp

Received: 25 February 2021

Accepted: 2 April 2021

Published: 7 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Modified-live vaccines (MLVs) against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSVs) are usually administrated to piglets at weaning when swine influenza A virus (swIAV) infections frequently occur. SwIAV infection induces a strong interferon alpha (IFN α) response and IFN α was shown to abrogate PRRSV2 MLV replication and an inherent immune response. In this study, we evaluated the impacts of swIAV infection on the replication of a PRRSV1 MLV (MLV1), post-vaccine immune responses and post-challenge vaccine efficacy at both the systemic and pulmonary levels. Piglets were either swIAV inoculated and MLV1 vaccinated 6 h apart or singly vaccinated or mock inoculated and mock vaccinated. Four weeks after vaccination, the piglets were challenged with a PRRSV1 field strain. The results showed that swIAV infection delayed MLV1 viremia by six days and post-vaccine seroconversion by four days. After the PRRSV1 challenge, the swIAV enhanced the PRRSV1-specific cell-mediated immunity (CMI) but the PRRSV1 field strain viremia was not better controlled. High IFN α levels that were detected early after swIAV infection could have been responsible for both the inhibition of MLV1 replication and CMI enhancement. Thus, whereas swIAV infection had a negative impact on humoral responses post-vaccination, it did not interfere with the protective effectiveness of the PRRSV MLV1 in our experimental conditions.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome; swine influenza A virus; modified-live vaccine; interference; interferon

1. Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a viral disease of swine with huge economic impact worldwide, characterized by reproductive failures in pregnant sows and respiratory disorders and growth retardation in piglets [1,2]. The disease is caused by PRRS viruses (PRRSVs), which are single-strand positive sense-RNA viruses that belong to the *Arteriviridae* family and exist as two different species originating from Europe for the PRRSV1 or from North America for the PRRSV2 (recently re-named as *Betaarterivirus suis* 1 and 2, respectively) [3,4]. Nowadays, both species are distributed worldwide but only PRRSV1 strains are circulating in France.

To control PRRS, modified-live vaccines (MLVs) are frequently used in sows or young piglets but only partial protection is achieved in the field, mainly reducing clinical signs by 70% in piglets [5]. In experimental conditions, the efficacy of PRRSV MLVs was demonstrated in specific pathogen free (SPF) piglets, reducing the viremia of the challenge strain in

inoculated animals and almost completely preventing its transmission to sentinel piglets [6]. The low efficacy of PRRSV MLVs shown under field conditions may be related to different factors. Thus, we previously demonstrated that maternally-derived neutralizing antibodies can decrease both the post-vaccination immune response and the PRRSV MLV1 efficacy [7,8]. Moreover, we suggested that viral infections, through interferon alpha (IFN α) secretion, could also affect the efficacy of the PRRSV MLV1 in the field [8].

IFN α is a cytokine of the innate immune response mainly induced after viral infections. In piglets, high levels of IFN α were detected during infections by coronaviruses such as porcine respiratory coronavirus (PRCoV) and transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and by rotavirus or by influenza A viruses (swIAVs) [9–11]. IFN α has an anti-viral activity against a broad spectrum of viruses and the PRRSV is particularly sensitive to the IFN α effect [12,13]. In response, the PRRSV has developed mechanisms to inhibit IFN α induction so that the PRRSV infection itself is generally characterized by low levels of IFN α [14,15].

The effect of IFN α on the PRRSV MLV or field strains has been studied to some extent. In 2017, Brockmeier et al. showed that delivering IFN α through an adenoviral vector (Ad5-pIFN α) completely inhibited the replication of a PRRSV2 MLV (MLV2) and abrogated the induction of the post-vaccine immune response [16]. Focusing on viruses with respiratory tropism as a PRRSV, Buddaert et al. showed decreased PRRSV1 titers in the lungs of pigs that were previously infected by PRCoV two days earlier compared with singly PRRSV1-infected pigs [12].

As major ethological agents of the porcine respiratory disease complex (PRDC), swIAVs and PRRSVs frequently co-circulate in pig herds and potential interactions between both viruses are very likely [17]. In French pig herds, an infection with the H1N2 but not the H1N1 swIAV was found to be associated with a PRRSV infection [18]. In France, the swIAV serological prevalence at the herd level was evaluated at 48.8% [19] and a high frequency of swIAV-positive herds was reported by the RESAVIP surveillance network among herds with respiratory disorders, with relatively stable levels from 2012 to 2018 ranging from 41.8% to 53.6% [20]. SwIAVs can circulate in piglets at weaning [21,22] even in the presence of maternally-derived antibodies (MDA) [23,24]. Furthermore, experimental infections showed that high IFN α levels were early detected in the serum and bronchoalveolar lavage fluid of swIAV-infected piglets both for H1N1 [11] and H1N2 virus subtypes [25] with a peak at 24 h post-inoculation.

Considering that the PRRSV MLV vaccination of piglets mainly takes place at weaning and that this period is also favorable to swIAV infections, a viral infection associated with high IFN α production, it appears interesting to investigate the possible interaction between swIAV infection and the PRRSV MLV vaccination. The objectives of the present study were to evaluate in SPF piglets the impact of an H1N2 swIAV infection on (i) the replication of a PRRSV1 MLV (MLV1) and (ii) the induction of the post-vaccination immune response, investigating the potential role of IFN α in these interactions. Finally, (iii) the effect of the swIAV infection on the vaccine efficacy was assessed towards a PRRSV1 challenge.

2. Materials and Methods

2.1. Viruses and Vaccines

The H1N2 swIAV A/Sw/France/Ille et Vilaine/0415/2011 strain is a human-like reassortant swine (GenBank accession No. KR699787-94) isolated from nasal swabs taken from pigs with acute respiratory disease and propagated and titrated in Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells for five passages.

The Porcilis PRRS vaccine (MSD, Beaucozé, France; batch No. A213BB01) was used in the in vivo experiment as the MLV1 vaccine. For in vitro analyses, the MLV1 vaccine strain was obtained by suspending the lyophilized vaccine in Eagle's minimal essential medium (EMEM), propagating and titrating it on MARC-145 cells for two and three passages for virus neutralization tests and for ELISPOT analyses, respectively.

The PRRSV1 “Finistere” strain, referenced as PRRS-FR-2005-29-24-1 (GenBank accession No. KY366411), was isolated in France in 2005 from a herd with reproductive failures in sows and propagated and titrated in porcine primary alveolar macrophages for two passages for animal inoculations and for six passages for ELISPOT analyses.

The H1N2 swIAV and PRRSV1 Finistere inocula were prepared by diluting each strain in EMEM.

2.2. Animal Experiment

Twenty-four 5-week-old SPF large white piglets from Anses-Ploufragan protected animal facilities were randomly distributed to four groups according to parental origin, weight and gender (Figure 1). At day 0 post-vaccination (D0 pv), piglets were either inoculated with 10^6 TCID₅₀ per pig (in 5 mL) of swIAV by an endotracheal route using a nasogastric probe of 4.5 mm of diameter and 50 cm long (SIVAC group) or mock inoculated with an EMEM cell culture medium (VAC, UNVAC and CTRL groups). Six hours later, piglets were either vaccinated using one dose of the MLV1 (2 mL) by intramuscular injection in the neck (SIVAC and VAC groups) or mock vaccinated with vaccine diluent (UNVAC and CTRL groups).

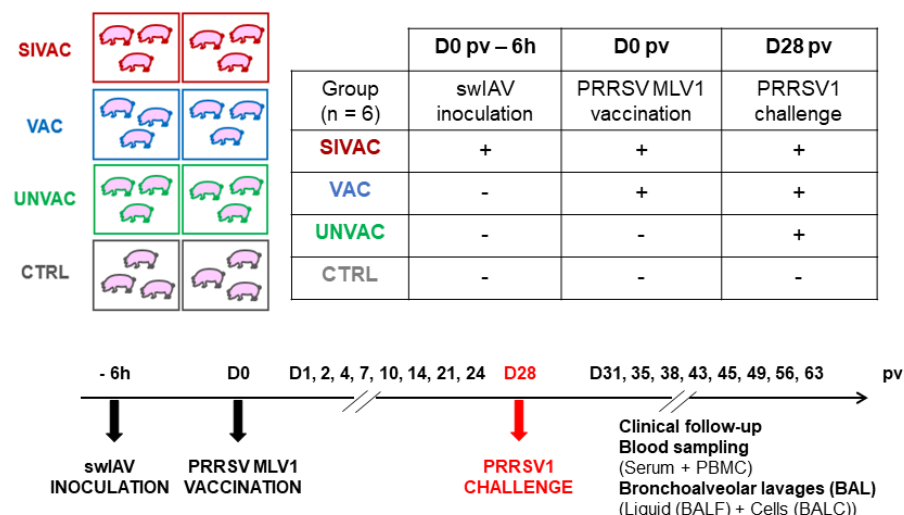


Figure 1. Description of the experiment design.

At D28 pv, piglets were either challenged with 5×10^5 TCID₅₀/pig (in 5 mL) of the PRRSV1 Finistere strain by intranasal inoculation (2.5 mL per nostril) (SIVAC, VAC and UNVAC groups) or mock inoculated with an EMEM cell culture medium (CTRL group).

The rectal temperature, daily weight and clinical score were monitored daily using a template adapted from Deblanc et al. [25]. A temperature higher than 40 °C was reported as hyperthermia. Serum samples were collected at D0, D1, D2, D4, D7, D10, D14, D21, D24, D31, D35, D38, D43, D45, D49, D56 and D63 pv. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified from heparinized blood at D0, D14, D24, D43 and D56 pv by Ficoll-paque gradient density separation using LeucoSep tubes (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria).

Bronchoalveolar lavages (BALs) were performed under general anesthesia using an intramuscular injection of 10 mg/kg de Zoletil® (Virbac, Carros, France) at D0, D1, D4, D7, D10, D14, D21, D24, D43 and D56 pv by infusing 2 × 20 mL of sterile PBS instilled in the lungs through a nasogastric probe of 4.5 mm of diameter and 50 or 57 cm long depending on the age of the animals (Laboratoires Euromedis, Neuilly-sous-Clermont, France). The BAL cells (BALCs) were separated from the BAL fluid (BALF) by centrifugation.

In addition, nasal swabs were sampled at D0, D1, D2, D4, D7 and D10 pv on piglets from the SIVAC group in order to identify potential lesions (especially in the lungs).

From D70 to D73 pv (D42 to D45 post-challenge (pc)), the animals were euthanized and a necropsy was conducted on each pig.

All experiments were authorized by the French Ministry for Research (project No. APAFIS#14266-2018032615007483v3) and approved by the national ethics committee number 16.

2.3. Viral Quantifications

The PRRSV1 genome from the serum and the BALF as well as the swIAV genome from the BALF were purified using the NucleoSpin 8 virus kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The SwIAV genome was isolated from nasal swab supernatants using the NucleoSpin 8 RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Before the challenge, the MLV1 strain genome was detected using the in-house pan-PRRSV qRT-PCR described by Charpin et al. [26]. After the challenge, the quantification of the Finistere strain genome was assessed by a specific qRT-PCR as previously described [27]. Briefly, PRRSV genomic RNA was further amplified using the SuperScript III platinum one-step qRT-PCR kit (Life Technologie, Carlsbad, CA, USA) with probes and primers, targeting either the ORF7 of the PRRSV1 (forward: 5'-AACGYTCCCTCTGCTTGC-3', reverse: 5'-CTCAACCTGAAAAGTACCTTCC-3', probe: 6FAM-CGATCCAGACGGCTTTTAAATCAAGGCG-TAM) or the ORF5 of the Finistere strain (forward: 5'-TATGCGAGCTGAATGGGACC-3', reverse: 5'-AGGATATGAGTGGCAACCGG-3', probe: 6FAM-TGGGCAGTTGAGAC TTTCGTGCT-TAM). The PRRSV RT-PCR was conducted in duplex with the amplification of the porcine beta-actin gene as the internal control (forward: 5'-CTCGATCATGAAGTGCGACGT-3', reverse: 5'-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3', probe: TET-ATCAGGAAGGACCTCTACGCCAACACGG-BHQ1). The PRRSV genomic loads in sera and BALF samples were quantified using a standard viral range of either the vaccine strain or the Finistere strain (with known infectious titers) diluted in a corresponding biological matrix collected from SPF pigs. The results were expressed as equivalent (eq) TCID₅₀/mL of the type of sample used.

SwIAV viral loads were quantified by RT-qPCR targeting the M gene as previously described [24]. Briefly, swIAV genomic RNA was further amplified using the GoTaq[®] Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, WI, USA) with probes and primers targeting the M gene (forward: 5'-AGATGAGTCYTCTAACCGAGGTCCG-3', reverse: 5'-TGCAAARACAYTTTCMAGTCTCTG-3', probe: 6FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ1). As for the PRRSV amplifications, the porcine beta-actin amplification was performed in duplex. The results were expressed as the M gene copy number per 10⁶ copies of the beta-actin gene for nasal swab supernatants or per ml of BALF.

For all viral genomic quantifications, samples with Ct values under the last dilution of the viral range were assigned to an extrapolated viral load and were included in the mean calculation.

2.4. Antibody Measurements

Antibodies against the N protein of the PRRSV were detected in serum using BioLisa PRRSV Ab ELISA (BioSella, Dardilly, France) according to manufacturer's instructions. For detection in BALF, the ELISA's protocol was adapted using a sample starting dilution of 1:2. Sample-to-positive (S/P) ratios with values equal to or higher than 0.4 were considered positive.

Neutralizing antibodies against the PRRSV were titrated by a virus neutralization test on MARC-145 cells using the MLV1 strain as previously described [7].

Antibodies against the nucleoprotein of the swIAV were detected in serum using ID Screen Influenza A Ab competition multi-species ELISA (ID.Vet, Grabels, France) as described in the manufacturer's instructions. In BALF, the protocol was modified starting from undiluted samples. Inhibition percentages with values equal to or lower than 45% were considered positive.

2.5. Cell-Mediated Immune Response (CMI) Assessment

PRRSV-specific IFN γ -secreting cells (IFN γ -SCs) were quantified in triplicate by ELISPOT in blood or in BAL as described by Fablet et al. [7] after 16 h stimulation of 4×10^5 PBMC or 5×10^5 BALC with either the MLV1 strain or the Finistere strain (obtained as described above) at a multiplicity of infection of 0.2. In addition, each sample was stimulated in triplicate with culture media or 10 μ g/mL of PHA (Eurobio, Les Ulis, France) as controls. The stimulation of PBMC or BALCs was performed on MultiScreen-IP 0.45 μ m nitrocellulose plates (Millipore, Burlington, MA, USA), previously coated overnight at 4 °C with 500 ng/well of an anti-pig IFN γ monoclonal antibody (mAb) (clone P2G10, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After cell stimulation, the secreted IFN γ was visualized by incubating plates for 2 h at room temperature (RT) with 25 ng/well of a biotinylated anti-pig IFN γ mAb (clone P2C11, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) followed by incubation for 1 h at RT in streptavidin alkaline phosphatase (1:1000 dilution, Caltag Medsystems, Buckingham, UK) then for 20 min at RT in alkaline phosphatase substrate kit reagents (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The number of spots per well was counted using an ImmunoSpot S5 UV Analyzer (CTL, Shaker Heights, OH, USA). The results were reported as numbers of IFN γ -SCs per million of PBMC or BALC.

2.6. Cytokine Measurements

Porcine IFN α was detected in serum or BALF using an in-house sandwich ELISA as described by Jamin et al. [28]. Briefly, Nunc-Immuno MaxiSorp surface plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight at RT with an anti-pig IFN α mAb (clone K9, PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA) at 7.5 μ g/mL in PBS then blocked for 1 h at 37 °C in PBS containing 5% BSA and 0.05% Tween 20. Serum samples and a standard range of porcine recombinant IFN α (PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA) were incubated for 2 h at RT. Biotinylated-IFN α mAb (1:200 dilution, clone F17, PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA; Lynx rapid biotin type1 antibody conjugation kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was then added for 2 h at RT and peroxidase-conjugated ExtrAvidin (1:1000 dilution, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) for 1 h at 37 °C. The peroxidase activity was measured using TMB substrate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) at 450 nm.

Porcine interleukine 10 (IL10) and interferon gamma (IFN γ) gene expressions were measured in BALCs using a TaqMan-based triplex real-time RT-PCR described by Petrov et al. that used both b-actin (forward: 5'-AGCGCAAGTACTCCGTGTG-3', reverse: 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3', probe: HEX-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-BHQ1) and GAPDH (forward: 5'ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA-3', reverse: 5'-GATCG AGTTGGGGCTGTGACT-3', probe: TXR-CCACCAACCCCAGCAAGAGCACGC-BHQ1) as endogenous controls to normalize the cytokine gene expression [29]. Petrov's RT-PCR was performed with a modified protocol using the SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and previously published primers and probes by Royae et al. for IL10 (forward: TGAGAACAGCTGCATCCACTTC, reverse: TCTGGTCCTTCGTTTGAAGAAA, probe: 6FAM-CAACCAGCCTGCCCCACAT GC-BHQ1) and IFN γ (forward: TGGTAGCTCTGGGAAACTGAATG, reverse: GGCTTTGC GCTGGATCTG, probe: 6FAM-CTTCGAAAAGCTGATTAATAATCCGGTAGATAAATCTGC-BHQ1) [30]. The results were expressed as relative expressions of target genes, calculated using the $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ equation with regard to the mean expression level in the BALCs of UNVAC pigs collected at the respective time point.

2.7. Statistical Analyses

All data and calculated areas under the curve (AUC) were compared between groups applying the Kruskal–Wallis test with Holm's post-hoc pairwise comparisons using R software 3.4.4 with the limit of the significance of the p -value < 0.05. On figures, different letters indicated the significant differences obtained by comparing groups either with the CTRL group (a) or with the UNVAC group (b) or between the VAC and SIVAC groups (c).

3. Results

3.1. Clinical Follow-Up during the Post-Vaccination Phase

After MLV1 vaccination, a peak of hyperthermia (40.4 ± 0.4 °C) was recorded only in the SIVAC group at D1 pv (Figure 2a). Compared with CTRL piglets, the average daily weight gains (ADWGs) were significantly reduced between D2 and D16 pv and between D9 and D16 pv for SIVAC and VAC piglets respectively (Figure 2b).

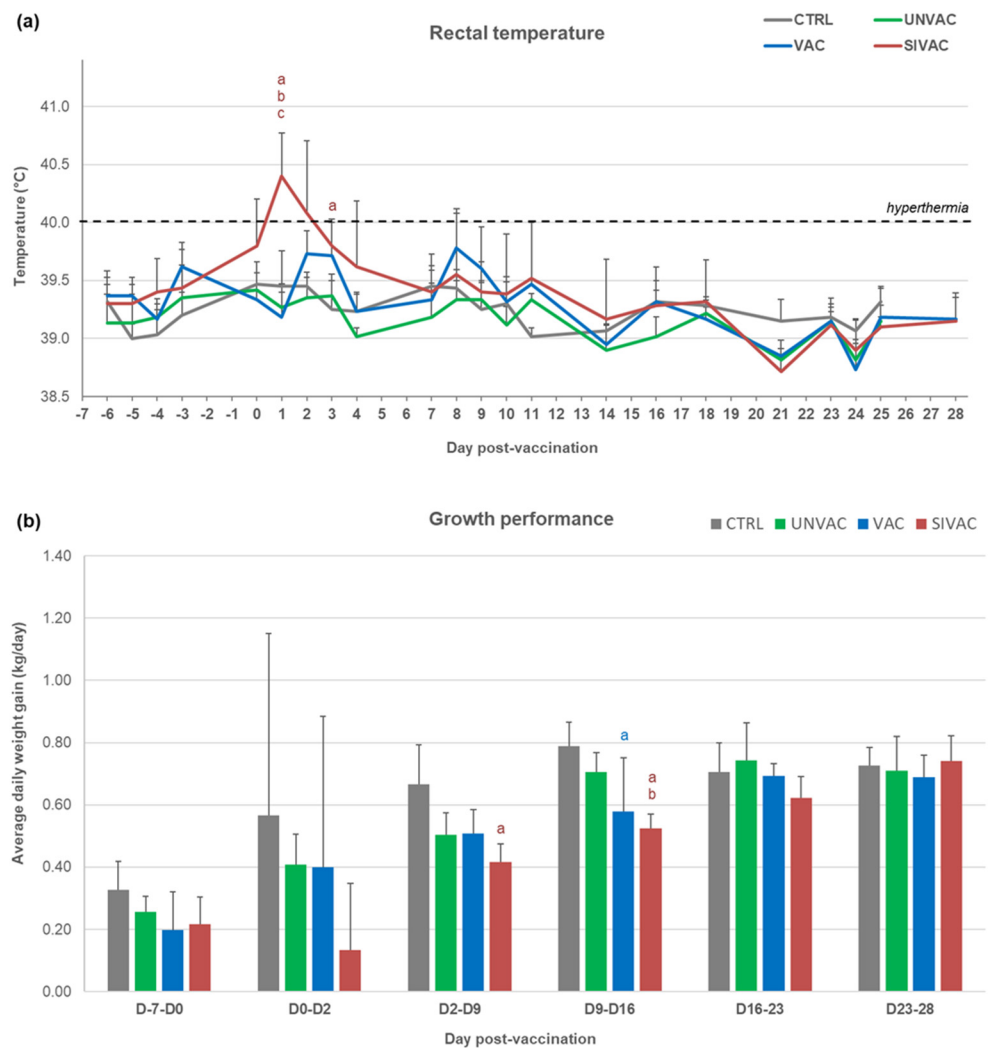


Figure 2. Clinical data recorded during the post-vaccination period (D0 to D28 pv). (a) Rectal temperature; (b) Average daily weight gain of piglets. All data are reported as the mean (\pm SD) of the results obtained from piglets in each group. Different letters (a–c) indicate that the considered group (specified by its color) was significantly different from the CTRL group (a), from the UNVAC group (b) or from the VAC group (c) with $p < 0.05$.

3.2. swIAV Infection Assessment in the Post-Vaccination Period

The swIAV genome was simultaneously detected as early as D1 pv (D1 post-swIAV inoculation) in nasal swab supernatants and BALF and until D7 and D10 pv in nasal swab supernatants and BALF, respectively (Figure 3). In BALF, viral loads were still high at D7 pv (5.97 ± 0.3 log₁₀ M gene copies/mL of BALF). Antibodies against swIAV were detected simultaneously in serum and BALF from D7 pv, confirming all SIVAC animals had been swIAV-infected.

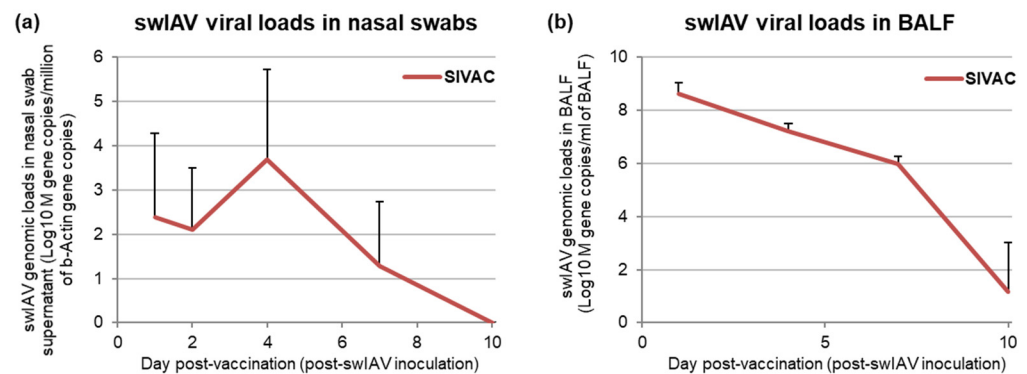


Figure 3. Swine influenza A virus (SwIAV) genomic loads quantified by M gene RT-qPCR (a) in nasal swab supernatants or (b) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) collected from piglets in the SIVAC group. Data are reported as the mean (\pm SD) of the group.

Quantification of IFN α in SIVAC piglets showed high levels in serum and BALF at D1 pv (D1 post-swIAV inoculation) with 668 ± 251 U/mL and 484 ± 360 U/mL, respectively (Figure 4). IFN α concentrations then decreased fast until being undetectable at D7 pv. In the VAC group, IFN α was only detected at D4 pv in serum at a very low level (36 ± 37 U/mL), which resulted in significant differences between the SIVAC and VAC groups at D1 and D2 pv in serum and at D1 and D4 pv in BALF.

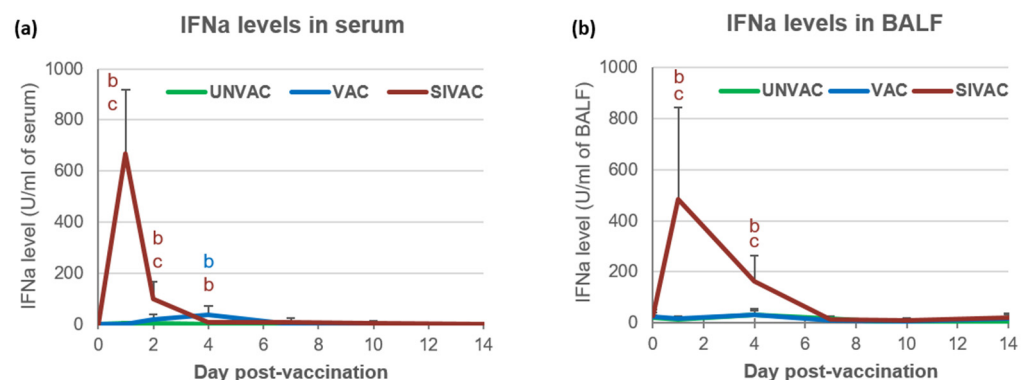


Figure 4. Interferon alpha (IFN α) levels quantified in (a) serum or (b) BALF. Data are reported as the mean (\pm SD) of the results obtained from all piglets in each group. Different letters (b,c) indicate that the considered group (specified by its color) was significantly different from the UNVAC group (b) or from the VAC group (c) with $p < 0.05$.

3.3. IFN γ and IL10 Gene Expression in BALCs in the Post-Vaccination Period

In the post-vaccination period (before the PRRSV1 challenge), the gene expressions of IFN γ and IL10 were quantified by RT-PCR in the BALCs of the SIVAC and VAC groups (Figure 5). The results showed an upregulation of both cytokines in the SIVAC group from D1 to D21 pv compared with the expression recorded in the UNVAC group at the same dates. The highest increased expressions were observed at D1 pv in the VAC group compared with the basal expression of the UNVAC piglets. Both cytokine gene expressions were not or only slightly upregulated before D21 pv, displaying a significant difference between the SIVAC and VAC groups from D1 to D10 pv for the expression of the IFN γ gene as well as the IL10 gene (on average 10 to 100-fold higher for the SIVAC group). At D21 pv, the difference between the SIVAC and VAC groups was still significant for the IFN γ expression only ($p = 0.045$).

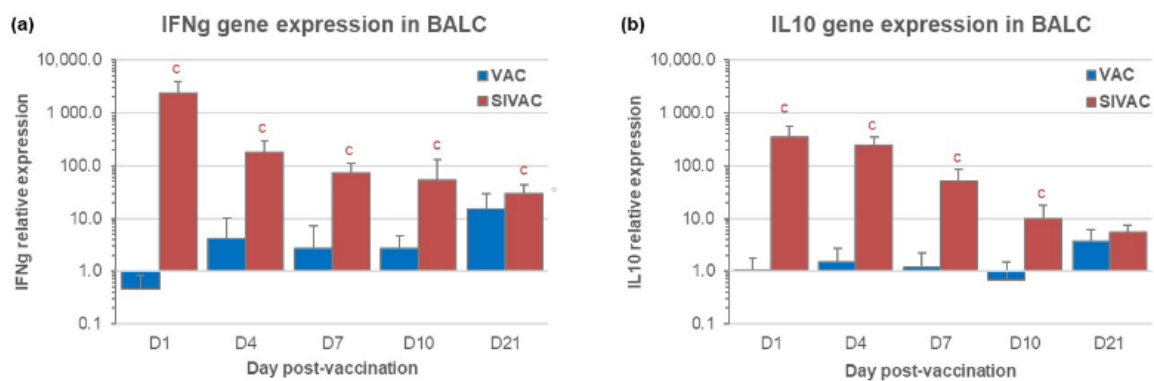


Figure 5. Relative gene expression assessed by RT-PCR in BALCs from the SIVAC and VAC groups for (a) IFN γ or (b) IL10 using expression results obtained in the UNVAC group as the reference. Data are reported as the mean (\pm SD) of the results obtained from all piglets in each group. Letter (c) indicates that the SIVAC group was significantly different from the VAC group with $p < 0.05$.

3.4. MLV1 Viremia and the PRRSV Immune Response Assessment during the Post-Vaccination Period

In the VAC group, the MLV1 genome was detected from D1 pv in all piglets. In the SIVAC group, it was detected at very low levels in the sera of two out of six piglets at D1 pv (under the limit of quantification) and remained undetectable in all animals until D7 pv when the viremia was first quantified (6/6 piglets) (Figure 6a). The viremia peak was reached at D14 pv for the VAC group (4.01 ± 0.31 log₁₀ eq TCID₅₀/mL of serum) and at D10 pv for the SIVAC pigs (3.02 ± 0.40 log₁₀ eq TCID₅₀/mL of serum). When comparing the two vaccinated groups over the post-vaccination period, the MLV1 viremia was significantly lower in the SIVAC group ($p = 0.011$ for comparisons of AUCs). In BALF, the vaccine genomic loads were quantified from D10 pv in two out of six VAC piglets and in four out of six SIVAC piglets, with no significant difference between the groups over the post-vaccination period ($p = 0.112$ for comparisons of AUCs) (Figure 6b).

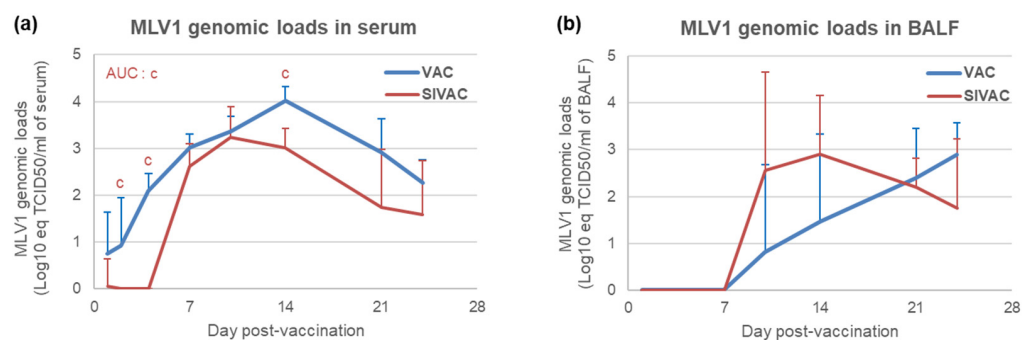


Figure 6. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genomic loads in (a) serum or in (b) BALF. All data are reported as the mean (\pm SD) of the results obtained from all piglets in each group. Letter (c) indicates that the SIVAC group was significantly different from the VAC group with $p < 0.05$. AUC: area under the curve.

Serum antibodies directed against the PRRSV appeared at D14 pv for SIVAC animals and at D10 pv for VAC piglets (Figure 7a) with a significantly lower ELISA S/ p -value for the SIVAC group at D10 pv. In BALF, the PRRSV antibodies were detected from D14 pv in three out of six SIVAC pigs and from D21 pv in three out of six VAC pigs without a significant difference between either group (Figure 7b).

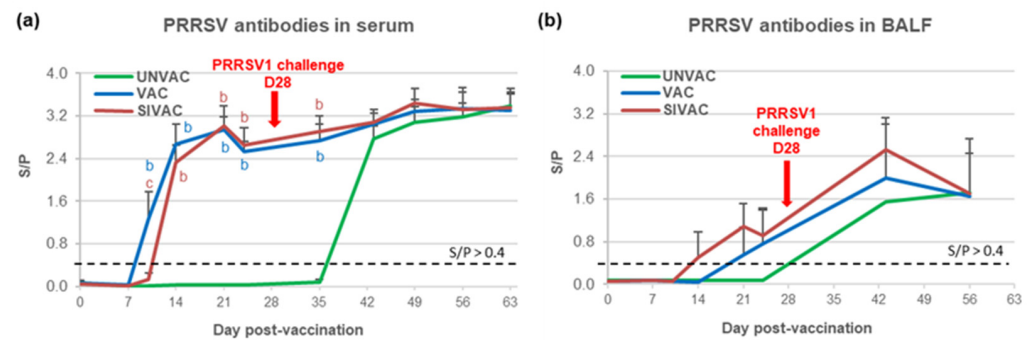


Figure 7. Anti-PRRSV antibody response assessed by ELISA in (a) serum or in (b) BALF. Data are reported as the mean (\pm SD) of results the obtained from all piglets in each group. Different letters (b,c) indicate that the considered group (specified by its color) was significantly different from the UNVAC group (b) or from the VAC group (c) with $p < 0.05$.

In blood, cellular immunity specific to the MLV1 strain (assessed by IFN γ ELISPOT), was observed from D14 pv in both the SIVAC and VAC groups (Figure 8a). At D24 pv, the number of IFN γ -SCs tended to be higher for SIVAC piglets (124 ± 74 and 44 ± 25 IFN γ -SCs per million of PBMC for the SIVAC and VAC groups, respectively; $p = 0.093$). Similarly, in lungs, IFN γ -SCs were only detected in BALCs from the SIVAC group (3/6 piglets at D14 pv and 1/6 at D24 pv) without a significant statistical difference between the SIVAC and VAC groups (Figure 8b).

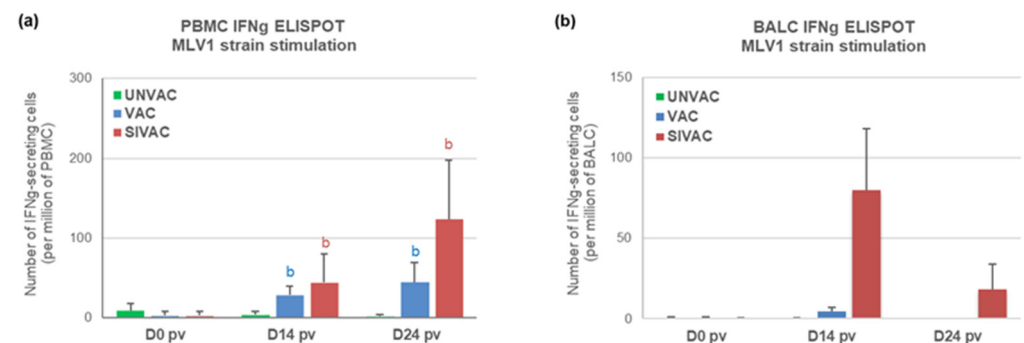


Figure 8. Anti-PRRSV cell-mediated immune response to the vaccine strain assessed by IFN γ ELISPOT in (a) PBMC or in (b) BALCs. Data are reported as the mean (\pm SD) of the results obtained from all piglets in each group. Different letters (b,c) indicate that the considered group (specified by its color) was significantly different from the UNVAC group (b) or from the VAC group (c) with $p < 0.05$. There is no significance c found in these graphs.

3.5. Evaluation of MLV1 Vaccine Efficacy after the PRRSV1 Challenge

After the PRRSV1 challenge, hyperthermia was detected only in piglets from the UNVAC group at D30 (D2 pc) and D35 pv (D5 pc) with a significant increase of mean rectal temperature in this group at D30 pv compared with the other groups (Figure 9a). Regarding growth performances, the ADWG was decreased in the UNVAC group between D28 and during the post-challenge period; no respiratory clinical signs were noticed and no pulmonary lesions were observed at necropsies performed from D70 to D73 pv, corresponding with the D70–73 post-swIAV or the D42–45 post-PRRSV1 challenge.

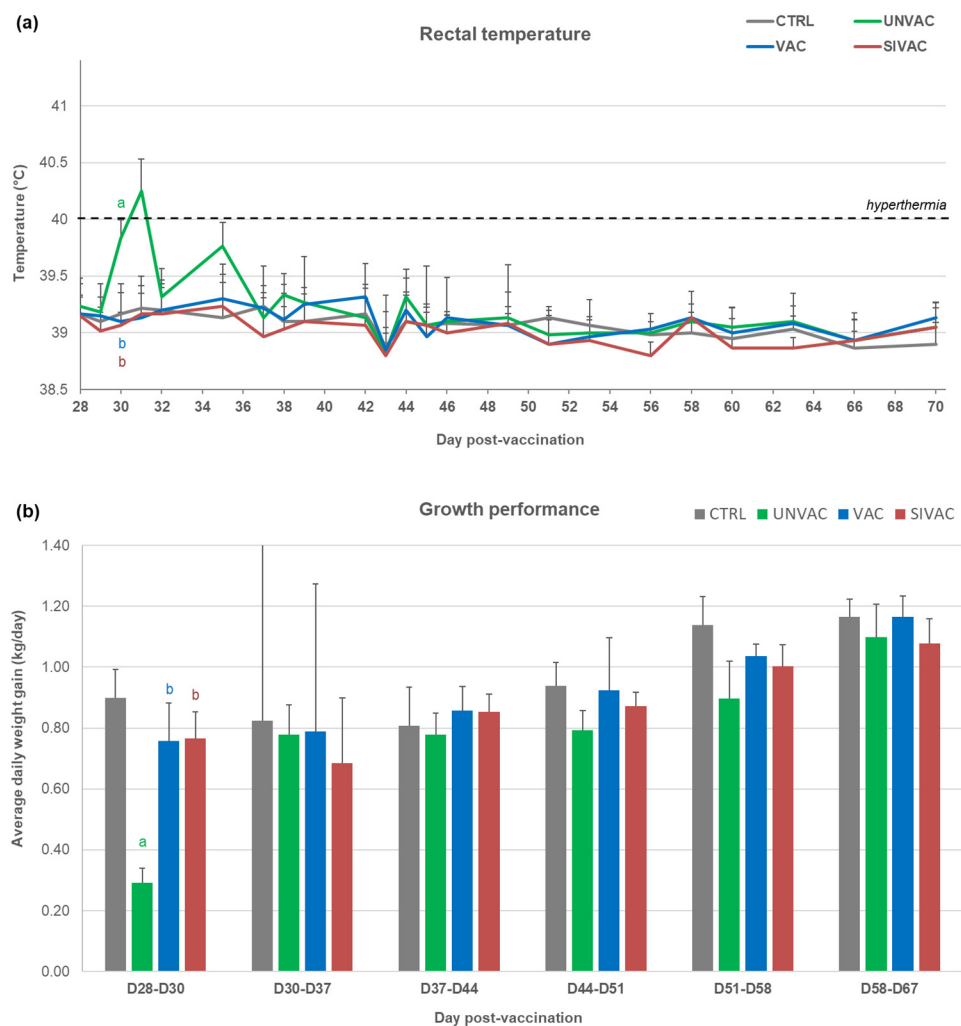


Figure 9. Clinical data recorded during the post-challenge period (D28 to D70 pv). (a) Rectal temperature; (b) Average daily weight gain of piglets. All data are reported as the mean (\pm SD) of the results obtained from piglets in each group. Different letters (a–c) indicate that the considered group (specified by its color) was significantly different from the CTRL group (a), from the UNVAC group (b) or from the VAC group (c) with $p < 0.05$. There is no significance c found in these graphs.

After the PRRSV1 challenge (at D28 pv), the quantification of the Finistere strain genomic load was assessed by a specific qRT-PCR. Compared with the UNVAC group, both the SIVAC and VAC groups displayed a significant reduction in challenge strain viremia over the entire post-challenge period ($p \leq 0.001$ for both comparisons of AUCs) with lower mean viremia peaks at D35 pv (D7 pc) (2.46 ± 0.45 , 2.45 ± 0.38 and 3.70 ± 0.39 log₁₀ eq TCID₅₀/mL for SIVAC, VAC and UNVAC groups, respectively) (Figure 10a). Finistere strain genomic loads in sera from SIVAC pigs were never different from those from VAC pigs.

Similar results were obtained in BALF (Figure 10b). Viral genomic loads were significantly reduced at D43 pv (D15 pc) for both the SIVAC and VAC groups compared with the UNVAC group ($p = 0.006$ and $p = 0.008$ for SIVAC and VAC, respectively).

Regarding the immune response induced after the PRRSV1 challenge, antibodies were detected from D43 pv (D15 post-challenge) in sera and BALF from UNVAC pigs at levels equivalent to those measured for the SIVAC and VAC groups (Figure 7). These results were confirmed by titrating the PRRSV neutralizing antibodies in sera. Concerning the cell-mediated immunity specific to the Finistere strain, significantly higher levels of IFN γ -SCs were detected in the blood of both the VAC and SIVAC groups compared with the UNVAC group at D43 pv (D15 pc) (Figure 11). At that time point, the CMI response

in the SIVAC group was also significantly higher than in the VAC group (281 ± 315 and 131 ± 151 and IFN γ -SCs per million of PBMC for the SIVAC and VAC groups, respectively, $p = 0.041$). At D56 pv, only the SIVAC group demonstrated a significantly higher level of IFN γ -SCs compared with the UNVAC group. No cellular immune response toward the Finistere strain was detected in BALF during the post-challenge period, whatever the group.

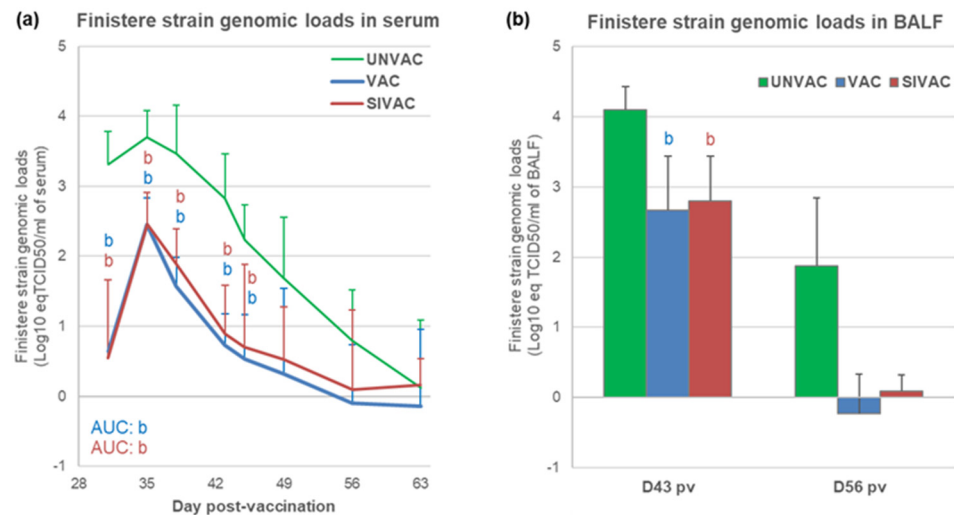


Figure 10. PRRSV1 Finistere strain genomic loads in (a) serum or in (b) BALF. Data are reported as the mean (\pm SD) of the results obtained from all piglets in each group. Different letters (b,c) indicate that the considered group (specified by its color) was significantly different from the UNVAC group (b) or from the VAC group (c) with $p < 0.05$. AUC: area under the curve. There is no significance c found in these graphs.

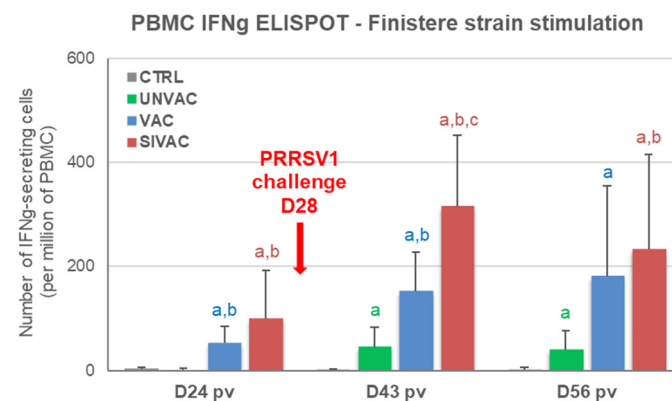


Figure 11. Anti-PRRSV cell-mediated response to the Finistere strain assessed by IFN γ ELISPOT in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Data are reported as the mean (\pm SD) of the results obtained from all piglets in each group. Different letters (a–c) indicate that the considered group (specified by its color) was significantly different from the CTRL group (a), from the UNVAC group (b) or from the VAC group (c) with $p < 0.05$.

4. Discussion

The objective of this study was to assess the hypothesis that a swIAV infection could affect the vaccine viremia, the post-vaccination immune response and the vaccine efficacy of an MLV1 in piglets, possibly through the production of large quantities of the anti-viral cytokine IFN α . Our results showed that, in the conditions of this study, a concomitant infection with the swIAV may actually interfere with an MLV1 vaccination at the systemic level by both delaying the vaccine viremia by one week and reducing the MLV1 genomic

loads at the viremia peak by 10-fold. In SIVAC piglets, the PRRSV seroconversion was also delayed for a few days compared with VAC piglets, probably as the consequence of the later production of MLV1 antigens. Surprisingly, the swIAV infection conversely affected the cell-mediated immune response (CMI) against the PRRSV, tending to enhance the number of MLV1-specific IFN γ -SCs during the post-vaccination period. This stronger CMI response in the SIVAC group was confirmed after the challenge with the PRRSV1 field strain 28 days after vaccination. Finally, however, the vaccine's efficacy, evaluated by analyzing clinical and virological parameters following the infectious challenge, was not impacted by swIAV infection in our experimental conditions.

In SIVAC piglets, hyperthermia appeared at D1 pv and growth retardation started the first week of the experiment (D2 to D9 pv) with no respiratory symptoms; furthermore, swIAV nasal excretion was detected from D1 to D7 pv (or post-swIAV inoculation). These results were similar to those we previously described when inoculating the same H1N2 swIAV strain in unvaccinated SPF piglets [25], indicating that in the present study swIAV infection was not impacted by a concomitant MLV1 vaccination. As expected, the swIAV infection induced a transient IFN α production for four days, with high levels quantified as early as D1 pv. At D7 pv, the detection of the MLV1 viremia coincided with both IFN α clearance and the end of swIAV nasal excretion. Although the MLV1 replication was only temporarily inhibited during one week, these results supported those obtained by Brockmeier et al. who showed that the inoculation of piglets with an adenoviral vector that produced IFN α (Ad5-pIFN α) completely abolished the replication of an MLV2 as well as the post-vaccination immune response [16]. The two studies displayed a similar period of IFN α production but the different unit used for IFN α quantification precluded a comparison of IFN α concentrations. The incomplete inhibition of the MLV1 replication observed in our study may rely on different factors. Firstly, IFN α production following swIAV infection was possibly weaker than after Ad5-pIFN α inoculation. Secondly, as Brockmeier et al. applied simultaneous inoculations of Ad5-pIFN α and MLV2, the 6 h delay we applied between swIAV inoculation and the MLV1 vaccination might have played a role. However, as delayed and reduced viremia were similarly observed when the Ad5-pIFN α was administrated simultaneously or one day before the inoculation of a PRRSV2 field strain, this suggested that the delay between IFN α induction and the MLV2 replication might not be so decisive [31,32]. Thirdly, although similar vaccine doses were used, a different sensitivity to IFN α between MLV1 and MLV2 cannot be excluded. Lastly, the differences in the vaccine strain replication kinetics between MLVs [33] may also to be considered. Indeed, the Ingelvac PRRS MLV2 used by Brockmeier et al. showed a faster onset of viremia compared with the Porcilis PRRS MLV1 we used with 80% and 0% of viremic piglets at D3 pv for the MLV2 and the MLV1, respectively [33]. In our study, the slow replication of the MLV1 we used and consequently its slower host systemic spread might have protected from an IFN α effect a few viral particles left in tissues close to the vaccination site. Alternatively, as MLV strains are able to persist in tonsils or lymph nodes of non-viremic animals [34,35], it is likely that a low replication of the MLV1 in these tissues could have occurred during the phase of no viremia observed in the SIVAC group after vaccination. Later, these virions may have been able to relaunch the vaccine viremia once the IFN α had disappeared.

The swIAV infection could also have protected the MLV1 from a complete elimination from the host during the phase of no vaccine viremia observed until D7 pv in the SIVAC group. The role of IL10 in the swIAV infection is unclear but the early production of this cytokine was reported in the lungs of swIAV singly-infected pigs or swIAV and PRRSV co-infected pigs [36,37]. In this study, we also quantified a high IL10 gene expression in BALCs from the SIVAC group with a peak as early as D1 pv. IL10 is known to be an immunosuppressive cytokine with capability of downregulating the host immune responses and especially the IFN γ T-helper 1 responses. IL10 was also shown to inhibit the expression of IFN α -induced genes [38]. Thus, the induction of IL10 production at an early

stage after MLV1 vaccination may have contributed to the vaccine strain survival within the host during the phase of no vaccine viremia.

Unlike field PRRSV1 strains (including the Finistere strain) that were detected in BALF as early as D2 post-inoculation [27], the detection of MLV1 in lungs was late for both vaccinated groups. However, contrary to the blood, no delay in vaccine strain detection was observed in BALF between the SIVAC and VAC piglets. In addition, the MLV1 strain seemed to replicate at a higher level in the lungs of SIVAC piglets compared with VAC ones. For SIVAC pigs, the MLV1 genome detection started from D10 pv when IFN α levels were undetectable and the swIAV was almost no longer present in BALF. Here also, we can hypothesize that the high IL10 levels measured in BALCs could have provided a favorable environment for MLV1 replication in the lungs of SIVAC piglets.

It is interesting to mention that the observations we made with the H1N2 strain we used in this study may not be reproduced with other swIAV strains or subtypes depending on the cytokine response they induce. For example, we recently showed that infection with a H1N2 variant induced a stronger cytokine response including Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) production than infection with the parental H1N2 [25]. In vitro studies showed that TNF α , combined or not with IFN beta, markedly inhibited respiratory syncytial virus replication in human lung epithelial cells [39]. Considering the role of IFN α and maybe other cytokines in the interference of the swIAV with PRRS MLVs, we could hypothesize that swIAV strains inducing a higher cytokine production could result in an exacerbated interference with PRRSV vaccination. In addition, the endotracheal route used for swIAV inoculation as well as the dose administered could have affected the results of this study. As reviewed by Van Reeth et Ma in 2013, an intranasal route or an endotracheal route using a lower swIAV dose lead to slower and lower viral load peaks in lungs, milder lung inflammation (lower levels of IFN α , IFN γ and pro-inflammatory cytokines in BALF) and less influenza-specific symptoms [40]. The MLV1 vaccination route could additionally have impacted the results obtained in this study as it was demonstrated that intramuscular PRRSV vaccination induced a lower cell-mediated immune response than intradermal vaccination [5,41].

Apart from the role of IFN α or other cytokines, alternate mechanisms could contribute to the interference induced by one virus on the replication of another such as competition for cellular receptors or competition for molecular substrates required for replication. PRRSV1 and the swIAV may interact at several stages [42]; thus, additional mechanisms independent of the host anti-viral response may also be involved in the results obtained.

In our experimental set-up, our results showed an interference of swIAV infection on MLV vaccination in piglets. In children vaccinated with an anti-influenza MLV, the vaccine viral loads were lower in children with a co-detection of a non-influenza respiratory virus at the time of vaccination [43], suggesting that other MLVs could be also subjected to viral interference. More globally, the interference of influenza with other viral infections has been confirmed. Essaidi-Laziosi et al. recently demonstrated that the influenza virus interfered with respiratory syncytial virus replication in in vitro reconstituted airway epithelial tissues through a mechanism involving the anti-viral action of type I and type III IFNs [44].

In SIVAC piglets, in contrast to the delay we observed for blood PRRSV seroconversion, PRRSV antibody detection seemed to occur earlier in the lungs. These results could firstly be linked to the faster MLV1 replication in the lungs of SIVAC piglets. Another hypothesis could be that the host immune response to the swIAV infection in lungs associated with a recruitment of immune cells such as dendritic cells and $\gamma\delta$ T cells [45] would have stimulated an earlier production of PRRSV antibodies. Interestingly, despite a high individual variability, the post-vaccination CMI against the PRRSV tended to be enhanced by the swIAV infection in the blood as in the lungs. Moreover, the gene expression of IFN γ was upregulated in the BALCs of the SIVAC group. In this group, the balance between Th1-related IFN γ and Th2-related IL10 could be in favor of the Th1 response as the gene expression upregulation was ten-fold higher for IFN γ than for IL10. At the systemic level, we previously detected the H1N2 swIAV-specific CMI from D7 post-infection [25], which

was earlier than the response generally induced against MLV1. In the SIVAC group, the recruitment of the immune cells involved in swIAV-specific CMI could thus have stimulated the anti-MLV1 CMI, explaining it was detected faster than in the VAC group especially in the lungs where both viruses were co-localized. The greater induction of CMI was then confirmed after the PRRSV1 challenge when a significantly higher IFN γ -SC count was observed at D43 pv (D15 post-challenge) in SIVAC pigs compared with VAC pigs. Beyond its anti-viral effect, IFN α can also activate the adaptive cellular immune response by stimulating the dendritic cells that trigger antigen-specific T cell proliferation [46]. A correlation between the IFN α and IFN γ responses was demonstrated after the co-administration of an IFN α -encoding plasmid and MLV2 [30]. Similarly, Brockmeier et al. showed an increase in IFN γ -SCs when they administered an Ad5-pIFN α simultaneously to a PRRSV2 field strain [31]. The enhanced PRRSV-specific CMI observed in SIVAC piglets after the PRRSV challenge was not sufficient to improve the control of the PRRSV viremia. Nevertheless, this better CMI could have at least counterbalanced the late PRRSV humoral response (linked to the delayed vaccine viremia) we measured in the SIVAC piglets.

In our experimental conditions, we demonstrated that swIAV infection altered the PRRSV1 MLV viremia and immune responses in piglets with no impact on vaccine efficacy. However, as discussed earlier, an interference on vaccine efficacy could be expected depending on the delay between swIAV infection and PRRSV MLV vaccination, the swIAV subtype, the PRRSV MLV strain, the routes and doses used for swIAV infection or the piglet immune status. We could expect that our study may pave the way for other studies to investigate the interference between PRRSV MLVs and swIAVs and also more globally between PRRSV MLVs and other swine viral infections that are frequently detected at the time of MLV vaccination. Better deciphering the interaction between PRRSV MLVs and swine viral infections seems to be essential for a better understanding of the poor efficacy of MLVs under field conditions and to improve their effectiveness.

Author Contributions: PRRSV analyses: P.R., M.L.D. and S.M.; swIAV analyses: C.D., S.G. and N.B.; cytokine analyses: P.R. and J.B.; statistical analyses: P.R.; interpretation and visualization: P.R. and C.D.; draft manuscript writing: P.R. and O.B.; supervision: O.B., G.S. and F.P.; conceptualization and funding: G.S. and O.B. All of the authors contributed to reviewing and editing the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a “European PRRS Research Award 2017”. J.B. received a PhD thesis fellowship from Université de Rennes (UNIR), France, in the framework of grant agreements with Région Bretagne, Conseil Départemental des Côtes d’Armor and Saint-Brieuc Armor Agglomération, France.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Gérald Le Diguerher, Jean-Philippe Moysan and Nadège Morin for animal care. We are also grateful to Jennifer Richardson for access to the ELISPOT reader at UMR 1161 Virology, ANSES-INRAE-ENVA, ANSES Animal Health Laboratory, Maisons-Alfort, France.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lunney, J.K.; Benfield, D.A.; Rowland, R.R. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: An update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res.* **2010**, *154*, 1–6. [[CrossRef](#)]
2. Nathues, H.; Alarcon, P.; Rushton, J.; Jolie, R.; Fiebig, K.; Jimenez, M.; Geurts, V.; Nathues, C. Cost of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at individual farm level—An economic disease model. *Prev. Vet. Med.* **2017**, *142*, 16–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kuhn, J.H.; Lauck, M.; Bailey, A.L.; Shchetinin, A.M.; Vishnevskaya, T.V.; Bao, Y.; Ng, T.F.; LeBreton, M.; Schneider, B.S.; Gillis, A.; et al. Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. *Arch. Virol.* **2016**, *161*, 755–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Siddell, S.G.; Walker, P.J.; Lefkowitz, E.J.; Mushegian, A.R.; Adams, M.J.; Dutilh, B.E.; Gorbalenya, A.E.; Harrach, B.; Harrison, R.L.; Junglen, S.; et al. Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018). *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 943–946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Martelli, P.; Gozio, S.; Ferrari, L.; Rosina, S.; De Angelis, E.; Quintavalla, C.; Bottarelli, E.; Borghetti, P. 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* **2009**, *27*, 3788–3799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Rose, N.; Renson, P.; Andraud, M.; Paboeuf, F.; Le Potier, M.F.; Bourry, O. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) modified-live vaccine reduces virus transmission in experimental conditions. *Vaccine* **2015**, *33*, 2493–2499. [[CrossRef](#)]
7. Fablet, C.; Renson, P.; Eono, F.; Mahe, S.; Eveno, E.; Le Dimna, M.; Normand, V.; Leuret, A.; Rose, N.; Bourry, O. Maternally-derived antibodies (MDAs) impair piglets' humoral and cellular immune responses to vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vet. Microbiol.* **2016**, *192*, 175–180. [[CrossRef](#)]
8. Renson, P.; Fablet, C.; Andraud, M.; Normand, V.; Leuret, A.; Paboeuf, F.; Rose, N.; Bourry, O. Maternally-derived neutralizing antibodies reduce vaccine efficacy against porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vaccine* **2019**, *37*, 4318–4324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Charley, B.; Riffault, S.; Van Reeth, K. Porcine innate and adaptive immune responses to influenza and coronavirus infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1081*, 130–136. [[CrossRef](#)]
10. Chepngeno, J.; Takanashi, S.; Diaz, A.; Michael, H.; Paim, F.C.; Rahe, M.C.; Hayes, J.R.; Baker, C.; Marthaler, D.; Saif, L.J.; et al. Comparative Sequence Analysis of Historic and Current Porcine Rotavirus C Strains and Their Pathogenesis in 3-Day-Old and 3-Week-Old Piglets. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 780. [[CrossRef](#)]
11. Barbe, F.; Atanasova, K.; Van Reeth, K. Cytokines and acute phase proteins associated with acute swine influenza infection in pigs. *Vet. J.* **2011**, *187*, 48–53. [[CrossRef](#)]
12. Buddaert, W.; Van Reeth, K.; Pensaert, M. In vivo and in vitro interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *440*, 461–467. [[CrossRef](#)]
13. Luo, R.; Fang, L.; Jin, H.; Jiang, Y.; Wang, D.; Chen, H.; Xiao, S. Antiviral activity of type I and type III interferons against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Antivir. Res.* **2011**, *91*, 99–101. [[CrossRef](#)]
14. Liu, K.; Ma, G.; Liu, X.; Lu, Y.; Xi, S.; Ou, A.; Wei, J.; Li, B.; Shao, D.; Li, Y.; et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus counteracts type I interferon-induced early antiviral state by interfering IRF7 activity. *Vet. Microbiol.* **2019**, *229*, 28–38. [[CrossRef](#)]
15. Wang, R.; Zhang, Y.J. Antagonizing interferon-mediated immune response by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 315470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Brockmeier, S.L.; Loving, C.L.; Eberle, K.C.; Hau, S.J.; Buckley, A.; Van Geelen, A.; Montiel, N.A.; Nicholson, T.; Lager, K.M. Interferon alpha inhibits replication of a live-attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine preventing development of an adaptive immune response in swine. *Vet. Microbiol.* **2017**, *212*, 48–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Saade, G.; Deblanc, C.; Bougon, J.; Marois-Créhan, C.; Fablet, C.; Auray, G.; Belloc, C.; Leblanc-Maridor, M.; Gagnon, C.A.; Zhu, J.; et al. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Vet. Res.* **2020**, *51*, 80. [[CrossRef](#)]
18. Fablet, C.; Marois-Crehan, C.; Grasland, B.; Simon, G.; Rose, N. Factors associated with herd-level PRRSV infection and age-time to seroconversion in farrow-to-finish herds. *Vet. Microbiol.* **2016**, *192*, 10–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Hervé, S.; Gorin, S.; Quéguiner, S.; Barbier, N.; Eveno, E.; Dorenlor, V.; Eono, F.; Madec, F.; Rose, N.; Simon, G. Estimation of Influenza Seroprevalence in Slaughter Pigs in France in 2008–2009. In Proceedings of the Journées de la Recherche Porcine, Paris, France, 15–16 February 2011; pp. 281–282.
20. Hervé, S.; Garin, E.; Calavas, D.; Lecarpentier, L.; Ngwa-Mbot, D.; Poliak, S.; Wendling, S.; Rose, N.; Simon, G. Virological and epidemiological patterns of swine influenza A virus infections in France: Cumulative data from the RESAVIP surveillance network, 2011–2018. *Vet. Microbiol.* **2019**, *239*, 108477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Chamba Pardo, F.O.; Alba-Casals, A.; Nerem, J.; Morrison, R.B.; Puig, P.; Torremorell, M. Influenza Herd-Level Prevalence and Seasonality in Breed-to-Wean Pig Farms in the Midwestern United States. *Front. Vet. Sci.* **2017**, *4*, 167. [[CrossRef](#)]
22. Diaz, A.; Marthaler, D.; Culhane, M.; Sreevatsan, S.; Alkhamis, M.; Torremorell, M. Complete Genome Sequencing of Influenza A Viruses within Swine Farrow-to-Wean Farms Reveals the Emergence, Persistence, and Subsidence of Diverse Viral Genotypes. *J. Virol.* **2017**, *91*. [[CrossRef](#)]
23. Deblanc, C.; Herve, S.; Gorin, S.; Cador, C.; Andraud, M.; Queguiner, S.; Barbier, N.; Paboeuf, F.; Rose, N.; Simon, G. Maternally-derived antibodies do not inhibit swine influenza virus replication in piglets but decrease excreted virus infectivity and impair post-infectious immune responses. *Vet. Microbiol.* **2018**, *216*, 142–152. [[CrossRef](#)]
24. Cador, C.; Herve, S.; Andraud, M.; Gorin, S.; Paboeuf, F.; Barbier, N.; Queguiner, S.; Deblanc, C.; Simon, G.; Rose, N. Maternally-derived antibodies do not prevent transmission of swine influenza A virus between pigs. *Vet. Res.* **2016**, *47*, 86. [[CrossRef](#)]
25. Deblanc, C.; Quéguiner, S.; Gorin, S.; Chastagner, A.; Hervé, S.; Paboeuf, F.; Simon, G. Evaluation of the Pathogenicity and the Escape from Vaccine Protection of a New Antigenic Variant Derived from the European Human-Like Reassortant Swine H1N2 Influenza Virus. *Viruses* **2020**, *12*, 1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Charpin, C.; Mahe, S.; Keranflech, A.; Belloc, C.; Cariolet, R.; Le Potier, M.F.; Rose, N. Infectiousness of pigs infected by the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is time-dependent. *Vet. Res.* **2012**, *43*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Renson, P.; Rose, N.; Le Dimna, M.; Mahe, S.; Keranflec'h, A.; Paboeuf, F.; Belloc, C.; Le Potier, M.F.; Bourry, O. Dynamic changes in bronchoalveolar macrophages and cytokines during infection of pigs with a highly or low pathogenic genotype 1 PRRSV strain. *Vet. Res.* **2017**, *48*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jamin, A.; Gorin, S.; Le Potier, M.F.; Kuntz-Simon, G. Characterization of conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2006**, *114*, 224–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Petrov, A.; Beer, M.; Blome, S. Development and validation of a harmonized TaqMan-based triplex real-time RT-PCR protocol for the quantitative detection of normalized gene expression profiles of seven porcine cytokines. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108910. [[CrossRef](#)]
30. Royaeae, A.R.; Husmann, R.J.; Dawson, H.D.; Calzada-Nova, G.; Schnitzlein, W.M.; Zuckermann, F.A.; Lunney, J.K. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2004**, *102*, 199–216. [[CrossRef](#)]
31. Brockmeier, S.L.; Loving, C.L.; Nelson, E.A.; Miller, L.C.; Nicholson, T.L.; Register, K.B.; Grubman, M.J.; Brough, D.E.; Kehrl, M.E., Jr. The presence of alpha interferon at the time of infection alters the innate and adaptive immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **2012**, *19*, 508–514. [[CrossRef](#)]
32. Brockmeier, S.L.; Lager, K.M.; Grubman, M.J.; Brough, D.E.; Etyreddy, D.; Sacco, R.E.; Gauger, P.C.; Loving, C.L.; Vorwald, A.C.; Kehrl, M.E., Jr.; et al. Adenovirus-mediated expression of interferon-alpha delays viral replication and reduces disease signs in swine challenged with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vir. Immunol.* **2009**, *22*, 173–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Martínez-Lobo, F.J.; de Lome, L.C.; Díez-Fuertes, F.; Segalés, J.; García-Artiga, C.; Simarro, I.; Castro, J.M.; Prieto, C. Safety of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Modified Live Virus (MLV) vaccine strains in a young pig infection model. *Vet. Res.* **2013**, *44*, 115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rowland, R.R.; Lawson, S.; Rossow, K.; Benfield, D.A. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet. Microbiol.* **2003**, *96*, 219–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Madapong, A.; Temeeyasen, G.; Saeng-Chuto, K.; Tripipat, T.; Navasakuljinda, W.; Boonsoongnern, A.; Tantituvanont, A.; Nilubol, D. Humoral immune responses and viral shedding following vaccination with modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 139–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Turlewicz-Podbielska, H.; Czyżewska-Dors, E.; Pomorska-Mól, M. Respiratory viral infections drive different lung cytokine profiles in pigs. *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 5. [[CrossRef](#)]
37. Pomorska-Mól, M.; Markowska-Daniel, I.; Kwit, K.; Czyżewska, E.; Dors, A.; Rachubik, J.; Pejsak, Z. Immune and inflammatory response in pigs during acute influenza caused by H1N1 swine influenza virus. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 2605–2614. [[CrossRef](#)]
38. Ito, S.; Ansari, P.; Sakatsume, M.; Dickensheets, H.; Vazquez, N.; Donnelly, R.P.; Larner, A.C.; Finbloom, D.S. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha-and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* **1999**, *93*, 1456–1463. [[CrossRef](#)]
39. Merolla, R.; Rebert, N.A.; Tsviste, P.T.; Hoffmann, S.P.; Panuska, J.R. Respiratory syncytial virus replication in human lung epithelial cells: Inhibition by tumor necrosis factor alpha and interferon beta. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1995**, *152*, 1358–1366. [[CrossRef](#)]
40. Van Reeth, K.; Ma, W. Swine influenza virus vaccines: To change or not to change—that's the question. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *370*, 173–200. [[CrossRef](#)]
41. Madapong, A.; Saeng-Chuto, K.; Boonsoongnern, A.; Tantituvanont, A.; Nilubol, D. Cell-mediated immune response and protective efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome virus modified-live vaccines against co-challenge with PRRSV-1 and PRRSV-2. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Saade, G.; Ménard, D.; Hervet, C.; Renson, P.; Hue, E.; Zhu, J.; Dubreil, L.; Paillet, R.; Pronost, S.; Bourry, O.; et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Interferes with Swine Influenza A Virus Infection of Epithelial Cells. *Vaccines* **2020**, *8*, 508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Boikos, C.; Papenburg, J.; Martineau, C.; Joseph, L.; Scheifele, D.; Chilvers, M.; Lands, L.C.; De Serres, G.; Quach, C. Viral interference and the live-attenuated intranasal influenza vaccine: Results from a pediatric cohort with cystic fibrosis. *Hum. Vaccines Immunother.* **2017**, *13*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Essaidi-Laziosi, M.; Geiser, J.; Huang, S.; Constant, S.; Kaiser, L.; Tapparel, C. Interferon-Dependent and Respiratory Virus-Specific Interference in Dual Infections of Airway Epithelia. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 10246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Crisci, E.; Fraile, L.; Montoya, M. Cellular Innate Immunity against PRRSV and Swine Influenza Viruses. *Vet. Sci.* **2019**, *6*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Le Bon, A.; Tough, D.F. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, *14*, 432–436. [[CrossRef](#)]

Conclusion

A l'issue de cet essai, nous avons observé que l'infection concomitante par le swIAV pouvait interférer avec la vaccination MLV-1 en retardant de six jours la virémie vaccinale et de quatre jours la séroconversion anti-SDRPV, ceci vraisemblablement en raison de l'effet antiviral de l'IFN- α produit suite à l'infection swIAV. Egalement, il a été mis en évidence que la réponse cellulaire post-challenge est plus forte chez les animaux préinfectés/vaccinés (SIVAC) que chez les animaux seulement vaccinés (VAC), probablement en raison d'un effet immuno-stimulant de l'IFN- α .

En termes d'efficacité vaccinale, objectivée ici par le niveau de virémie de la souche d'épreuve, aucune différence n'a été observée entre les groupes VAC et SIVAC. Cette absence d'effet de l'infection swIAV sur l'efficacité vaccinale pourrait être liée à la conjonction d'un effet délétère de l'infection swIAV sur la réponse humorale systémique vis-à-vis du SDRP et d'un effet positif sur la réponse à médiation cellulaire.



**DISCUSSION
GENERALE et
PERSPECTIVES**

Dans les zones de production où le SDRPV et les swIAV sont répandus, il existe un risque élevé que les exploitations porcines soient infectées par ces deux virus en même temps. Afin d'apporter de nouvelles connaissances sur le CRP et son contrôle, les objectifs de ce projet de thèse étaient d'étudier 1) l'impact d'une infection par le SDRPV sur une infection subséquente par le swIAV ; 2) l'impact d'une infection à swIAV sur le devenir d'une infection SDRPV en cours, ceci par des approches *in vivo* et *in vitro* et 3) l'impact d'une infection grippale sur la vaccination anti-SDRPV effectuée à l'aide d'un MLV.

Lors de la co-infection SDRPV/swIAV chez le porc (cf chapitre 1), une interaction bidirectionnelle entre les infections SDRPV et swIAV a été observée. La pré-infection SDRPV a réduit les signes cliniques, les réponses inflammatoire et antivirale liées à l'infection à swIAV, et a augmenté la réponse à médiation humorale vis-à-vis de l'infection à swIAV dans les poumons des porcs co-infectés, comparativement aux porcs mono-infectés swIAV. En parallèle, l'infection à swIAV a diminué la charge génomique du SDRPV au niveau pulmonaire et a permis une induction plus rapide de la réponse à médiation cellulaire vis-à-vis du SDRPV, comparativement aux porcs mono-infectés SDRPV. Les ACP, nous ont permis de mettre en évidence le rôle important de l'IFN- α dans ces interférences virales. Des analyses complémentaires des mécanismes sous-jacents pouvant intervenir dans cette interaction bidirectionnelle ont été initiées dans un système de co-culture NTPr/PAM (cf chapitre 2). Nos premiers résultats suggèrent de façon similaire (i) l'existence d'une interaction bidirectionnelle sur les multiplications du SDRPV et du swIAV et (ii) que l'impact de cette co-infection sur la réponse IFN-I serait dépendant du délai entre les inoculations des deux virus. Un autre essai mené chez le porc (cf chapitre 3) a montré que, sans impacter l'efficacité vaccinale, l'infection à swIAV interférait avec la vaccination à MLV-1, en retardant la virémie vaccinale et en induisant une réponse à médiation cellulaire plus forte après un challenge SDRPV-1 ; ceci probablement en raison de l'induction de l'IFN- α par l'infection à swIAV.

1. Impact de l'IFN- α induit par l'infection à swIAV lors d'une co-infection par une souche sauvage ou une souche atténuée de SDRPV

Au cours de ce projet de thèse, nous avons montré, *in vivo*, que l'infection par le swIAV H1_{hu}N2 induit rapidement la production d'IFN- α , observée à 24h pi tant au niveau systémique que pulmonaire (cf chapitres 1 et 3). Cette induction de la voie de l'IFN-I par l'infection à swIAV H1_{hu}N2 a également été mise en évidence *in vitro* par la stimulation des ISG (cf

chapitre 2). Par ailleurs, lors de la super-infection SDRPV-1/H1_{hu}N2, une forte diminution de la multiplication du SDRPV-1 a été observée au niveau pulmonaire, mais pas au niveau systémique, dès le lendemain de l'inoculation du virus grippal lorsque celle-ci survient une semaine après l'inoculation du SDRPV (cf chapitre 1). L'inoculation du swIAV H1_{hu}N2 6 heures avant la vaccination MLV-1 a quant à elle entraîné un retard de 6 jours dans l'apparition de la virémie du MLV et une diminution de la charge vaccinale au niveau systémique (cf chapitre 3). Les IFN-I sont connus pour promouvoir la défense anti-virale et bloquer la multiplication de différents virus (Tomasello et al., 2014). Il a été notamment montré que le SDRPV était sensible à l'IFN- α (Albina et al., 1998). On peut donc supposer que la diminution de la multiplication du SDRPV-1 au niveau pulmonaire et de la virémie MLV-1 puissent être dues à l'effet antiviral de l'IFN- α induit par l'infection à swIAV. Ce lien entre induction de l'IFN- α et diminution de la réplication du SDRPV-1 a d'ailleurs été confirmé par nos ACP.

D'autre part, le fait que l'infection à swIAV ait impacté la virémie MLV-1 (cf chapitre 3), alors qu'elle n'a eu aucun effet sur la virémie du SDRPV-1 lors de l'expérience de super-infection (cf chapitre 1), pourrait être lié à la différence de concentration sérique d'IFN- α observée au cours de nos deux essais chez le porc. En effet, une concentration sérique plus importante d'IFN- α a été rapportée chez les porcs infectés swIAV puis vaccinés (667 UI/ml en moyenne pour les animaux infectés swIAV/vaccinés MLV à 24 hpi, cf chapitre 3), comparativement aux porcs co-infectés SDRPV/swIAV (98 UI/ml à 24 hpi, cf chapitre 1). Cette différence est vraisemblablement liée à la séquence des inoculations et au délai entre ces inoculations. Ainsi, dans le cas des animaux inoculés swIAV puis vaccinés MLV 6h plus tard, la vaccination MLV n'a pas eu d'impact sur la sécrétion d'IFN- α , d'une part car cette vaccination a eu lieu après l'infection swIAV, et d'autre part du fait que la réplication du MLV, et son éventuel effet inhibiteur de l'induction d'IFN- α , ont été complètement bloqués pendant plusieurs jours.

Si l'IFN- α induit par l'infection à swIAV a retardé et réduit la virémie MLV, celui-ci n'a pas impacté l'efficacité vaccinale (Cf chapitre 3). Or, Brockmeier et al., avait montré que l'IFN- α était capable d'inhiber complètement la réplication d'un MLV-2 et annihiler l'efficacité du vaccin (Brockmeier et al., 2017). Il semblerait donc que 6 heures après l'infection à swIAV, la concentration d'IFN- α ne soit pas suffisante pour inhiber complètement la réplication d'un MLV-1. Il serait donc intéressant de 1) définir le moment à partir duquel le pic d'IFN- α est atteint après l'infection à swIAV et ainsi 2) vacciner les porcs contre le SDRPV au moment

de ce pic. Ceci permettrait peut-être à l'infection à swIAV de bloquer complètement la réplication du MLV et ainsi altérer également l'efficacité vaccinale. Au-delà de la concentration d'IFN- α ce pourrait être aussi la durée de cette sécrétion qui a été insuffisante pour bloquer complètement la réplication du MLV-1. Notre équipe a en effet montré au cours d'une précédente étude (Renson et al., 2019) qu'une sécrétion prolongée d'IFN- α mesurée chez des porcs conventionnels pouvait bloquer complètement la réplication du même MLV-1. Suite aux inoculations successives SDRPV-1/H1_{hu}N2 (cf chapitre 1), nous avons observé, au niveau systémique, la mise en place plus rapide de la réponse à médiation cellulaire vis-à-vis du SDRPV-1, comparativement aux porcs mono-infectés SDRPV-1. De façon similaire, la réponse à médiation cellulaire après challenge SDRPV-1 a été plus forte chez les porcs ayant été inoculés par le swIAV 6 heures avant la vaccination MLV-1 que chez les porcs vaccinés MLV-1 seul (cf chapitre 3). Comme une corrélation a été notée entre la production d'IFN- α et l'induction de la réponse à médiation cellulaire vis-à-vis du SDRPV-1 (cf chapitre 1), on peut penser que l'IFN- α a pu 1) stimuler la réponse à médiation cellulaire vis-à-vis du SDRPV-1, comme précédemment observé après les inoculations simultanées d'un Ad5-pIFN- α et d'un SDRPV-2 (Brockmeier et al., 2009), et 2) améliorer l'immunogénicité du MLV-1, comme précédemment rapporté après co-inoculation d'un plasmide d'expression de l'IFN- α et d'un MLV-2 (Royae et al., 2004). En complément, il serait intéressant d'inoculer le swIAV quelques jours après l'injection du MLV-1, une fois que sa réplication aura été initiée, afin de voir si, dans ce cas, l'infection à swIAV et l'induction de l'IFN- α qui en découle booste la réponse immunitaire cellulaire post-vaccinale, et améliore dans ce cas l'efficacité vaccinale. Outre l'impact bénéfique que peuvent avoir les IFN-I lors d'une infection par un virus sauvage, l'IFN- α est aussi connu pour avoir un effet délétère pour l'hôte lorsqu'il est produit de manière excessive conduisant notamment à une forte induction de la réponse pro-inflammatoire (Tomasello et al., 2014). En effet, au cours de notre étude *in vivo* (cf chapitre 1), nous avons mis en évidence que la réponse antivirale induite par l'infection à swIAV était accompagnée d'une réponse inflammatoire caractérisée par un pic d'haptoglobine dans le sang, ainsi qu'un afflux de granulocytes au site de l'infection. Nos analyses de corrélation ont mis en évidence un lien entre la production d'IFN- α , l'induction de la réponse inflammatoire et la manifestation de signes cliniques. Or, l'infection à SDRPV a permis de réduire la production d'IFN- α chez les porcs SDRPV/swIAV, comme précédemment observé par d'autres (Butler et al., 2014). Ceci a probablement conduit à une atténuation des signes cliniques et de la réponse pro-inflammatoire induits par l'infection grippale. Dans nos

conditions expérimentales, il semble donc que la pré-infection SDRPV soit « bénéfique » pour l'hôte vis-à-vis de l'exposition subséquente au swIAV, grâce à sa capacité à limiter la production d'IFN-I.

2. Impact des super-infections (SDRPV-1/swIAV H1_{hu}N2 et swIAV H1_{hu}N2/MLV-1/SDRPV-1) sur les réponses à médiation humorale

Lors des infections successives SDRPV/swIAV (cf chapitre 1), l'étude de la réponse à médiation humorale vis-à-vis du swIAV a montré des taux d'anticorps anti-swIAV (IgG, IgA, anti-HA et neutralisants) significativement plus élevés dans les poumons des porcs co-infectés SDRPV/swIAV comparativement aux porcs mono-infectés swIAV. A contrario, une telle différence n'a pas été observée entre les porcs SDRPV/swIAV et les porcs mono-infectés SDRPV en ce qui concerne la réponse humorale spécifique du SDRPV. En revanche, nous avons observé une réponse à médiation humorale anti-SDRPV plus précoce au niveau pulmonaire chez les porcs infectés swIAV puis vaccinés MLV, avant challenge SDRPV, comparativement aux porcs uniquement vaccinés (cf chapitre 3). Une précédente étude indique que ces réponses humorales plus élevées au niveau pulmonaire pourraient être liées à l'hypergammaglobulinémie induite par l'infection à SDRPV (Plagemann et al., 2005). Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons mesuré les taux d'IgG totales dans les sérums de l'ensemble des porcs de notre essai de super-infection SDRPV/swIAV (données non montrées). Cette analyse a mis en évidence une augmentation du taux d'IgG totales (ou hypergammaglobulinémie) pour les porcs SDRPV/swIAV. Cependant, de façon plus surprenante, nous n'avons pas observé cette hypergammaglobulinémie pour les porcs mono-infectés SDRPV. Une nouvelle analyse des taux d'IgG totales au niveau pulmonaire devrait être entreprise pour confirmer ces premiers résultats. D'autre part, de précédentes études ont montré que l'IFN-I, par la voie de signalisation de l'IFNAR, était capable de favoriser au niveau pulmonaire l'activation des cellules B et des réponses anticorps pendant une infection virale (Chang et al., 2007; Coro et al., 2006; McNab et al., 2015). Compte tenu de ces données, nous avons entrepris, par analyse de cytométrie en flux, d'étudier le pourcentage de lymphocytes B présents dans les poumons des porcs co-infectés comparativement aux porcs mono-infectés (données non présentées). Ces analyses n'ayant pas montré de différences entre les porcs co-infectés et les porcs mono-infectés, il serait intéressant de poursuivre ces investigations par d'autres approches, telle que l'immunohistochimie sur des coupes de poumons. Ainsi, si une augmentation de la population de lymphocytes B est observable, cela

conforterait l'hypothèse du rôle du recrutement des cellules B dans l'augmentation de la réponse humorale au niveau pulmonaire.

Par ailleurs, des niveaux légèrement supérieurs d'IL-10 ont été mesurés chez les porcs SDRPV/swIAV, comparativement aux porcs mono-infectés swIAV (cf chapitre 1). Sachant que l'IL-10 est capable d'induire la production d'IgM, d'IgG et d'IgA (Marcelletti and Katz, 1996), cette cytokine pourrait avoir eu un rôle protecteur et stimulateur des réponses à médiation humorale chez les animaux co-infectés.

3. Impact de la nature des virus utilisés sur l'interaction entre le virus grippal et le SDRPV

Les conséquences des co/super-infections SDRPV-1/swIAV(H1_{hu}N2) sur les réponses de l'hôte (inflammatoire, antivirale, humorale, cellulaire) et sur la sévérité des signes cliniques pourraient dépendre du sous-type ou lignage de swIAV. Nous avons fait le choix d'utiliser le sous-type H1_{hu}N2, car ce virus semblait davantage associé aux infections par le SDRPV-1, vue l'association significative entre la présence d'anticorps anti-H1_{hu}N2 et la présence d'anticorps anti-SDRPV-1 (Fablet et al., 2016). Mais trois sous-types de swIAV circulent de manière enzootique chez le porc, i.e. H1N1, H1N2 et H3N2. De précédentes études de co-infections SDRPV-1/H1N1 (Czyżewska-Dors et al., 2019; Pomorska-Mol et al., 2020; Van Reeth et al., 1996, 2001) et SDRPV-1/H3N2 (Pol et al., 1997) avaient mis en évidence soit une exacerbation (Czyżewska-Dors et al., 2019; Van Reeth et al., 1996), soit une absence de différence de signes cliniques entre les porcs co-infectés et les mono-infectés. Par ailleurs, une étude menée au laboratoire sur les co-infections Mhp/H1N1 et Mhp/H1N2 avait montré que les conséquences cliniques dépendaient du sous-type de swIAV (Deblanc et al., 2012). Ceci sous-entend donc que le sous-type de swIAV pourrait être un facteur déterminant dans l'interférence bidirectionnelle SDRPV/swIAV. Il serait donc intéressant d'utiliser notre modèle de co-infection (avec un délai d'une semaine entre les inoculations, cf chapitre) pour voir si l'interférence bidirectionnelle observée lors de la co-infection SDRPV-1/H1_{hu}N2 est reproduite avec d'autres sous-types de swIAV. Egalement, il serait intéressant d'étudier l'impact du sous-type de swIAV sur la vaccination MLV-1 et ainsi apporter une vue plus globale de l'effet des infections grippales sur la vaccination anti-SDRPV. Dans le Grand-Ouest de la France, un nouveau sous-type, le H1_{av}N2, a émergé en Bretagne en 2020, et est devenu majoritaire dans les élevages porcins. Il semblerait donc tout à fait intéressant d'étudier l'impact de ce nouveau virus sur l'efficacité vaccinale anti-SDRPV.

Au-delà du sous-type de swIAV, l'espèce de SDRPV pourrait aussi être un facteur important à considérer dans les modèles de co- ou super-infections SDRPV/swIAV. Ainsi, une précédente étude chez le porc utilisant un SDRPV-2 dans le cadre d'une inoculation simultanée avec un swIAV H1N1 avait mis en évidence une exacerbation des signes cliniques et lésionnels chez les porcs co-infectés comparativement aux porcs mono-infectés (Kitikoon et al., 2009). En revanche, dans les mêmes conditions d'inoculations simultanées, Pomorska et al., n'avaient pas montré de différences cliniques entre les porcs co-infectés SDRPV-1/H1N1 et les porcs mono-infectés (Pomorska-Mol et al., 2020). Les SDRPV-2 étant plus pneumovirulents que les SDRPV-1 (Martínez-Lobo et al., 2011), les conséquences d'une super-infection SDRPV-2/swIAV avec un délai d'une semaine entre les inoculations pourrait donc aboutir, non pas à une atténuation, mais plutôt à une exacerbation des signes cliniques. Il serait donc intéressant de comparer l'effet d'une primo-infection SDRPV-2 comparativement à une primo-infection SDRPV-1 pour confirmer ou non cette hypothèse. Actuellement, les SDRPV-2 ne circulent pas en France, mais ce genre d'étude serait utile dans des pays où les SDRPV-2 et SDRPV-1 circulent tous deux conjointement de front avec des swIAV, notamment en Asie ou en Amérique du Nord.

4. Impact du délai entre les inoculations virales lors des co et super-infections SDRPV-1/swIAV H1_{hu}N2

Le SDRPV induit une infection longue alors que les swIAV induisent des infections aiguës. Par conséquent nous avons choisi d'inoculer d'abord le SDRPV, puis, 8 jours plus tard, le swIAV, pour ainsi se rapprocher des situations les plus susceptibles de se produire sur le terrain. Cet intervalle de temps entre les deux inoculations virales correspond au délai nécessaire pour que les poumons des porcs EOPS soient déstabilisés suite à l'infection par le SDRPV et donc possiblement plus sensibles aux surinfections (Renson et al., 2017). Dans ces conditions expérimentales, nous avons observé une atténuation des signes cliniques et des réponses antivirale et inflammatoire vis-à-vis de l'infection à swIAV chez les porcs co-infectés, comparativement aux animaux mono-infectés swIAV. Parmi les précédentes études consacrées à la co/super-infection SDRPV/swIAV, seules deux font état de l'application d'un délai de 3, 7 ou 14 jours entre les deux inoculations virales (Pol et al., 1997; Van Reeth et al., 1996, 2001), les autres s'étant limitées à des inoculations simultanées (Czyżewska-Dors et al., 2019; Kitikoon et al., 2009; Pomorska-Mol et al., 2020). Mais aucune n'a rapporté d'atténuation du syndrome grippal. Elles décrivent, soit une exacerbation (Van Reeth et al.,

1996 ; Van Reeth et al., 2001 ; Kitikoon et al., 2009), soit aucune différence (Van Reeth et al., 2001 ; Pol et al., 1997 ; Pomorska-Mol et al., 2020) au niveau des signes cliniques comparativement aux porcs mono-infectés. Comme déjà dit plus haut, il pourrait y avoir un lien entre le délai d'inoculation des deux virus et la production d'IFN-I, qui a lui-même un rôle important dans les réponses cliniques. La répétition de l'expérience que nous avons menée en faisant varier le délai entre les inoculations du SDRPV-1 et du swIAV H1_{hu}N2 permettrait de vérifier cette hypothèse, mais les résultats des études menées *in vitro* par d'autres équipes confirment d'ores et déjà l'importance de cet intervalle de temps (Dobrescu et al., 2014; Provost et al., 2017; Saade et al., 2020). De notre côté, nous avons entrepris de développer un modèle de co-culture NPTr/PAM pour étudier l'impact de ce délai sur l'induction de la voie de l'interféron (cf chapitre 2). Nos premiers résultats indiquent que la production d'IFN- α est effectivement liée au délai entre les inoculations des deux virus. Après inoculations simultanées, une induction similaire ou légèrement supérieure de la voie de l'interféron a été observée, alors qu'après inoculations successives avec un délai d'une heure (SDRPV-1h-swIAV), nous avons obtenu une atténuation de la réponse antivirale, comparativement à la mono-infection swIAV. De façon intéressante, ces résultats vont donc dans le même sens que ceux obtenus au cours de notre étude *in vivo* (cf chapitre 1). Si on s'appuie sur le lien montré *in vivo* entre la réponse IFN- α et les manifestations cliniques, on peut donc supposer que l'inoculation simultanée des deux virus SDRPV et swIAV, qui ne semble pas diminuer l'induction de l'IFN-I, pourrait *a maxima* aboutir à un syndrome grippal de même intensité qu'après mono-infection swIAV.

5. Modèles infectieux chez les porcs EOPS et en co-culture NPTr/PAM pour l'étude de la co-/super-infection SDRPV/swIAV: intérêts, limites, perspectives

Au cours de l'essai expérimental ayant pour objectif d'étudier les infections successives SDRPV/swIAV (cf chapitre 1), nous avons pu reproduire les signes cliniques typiques des mono-infections SDRPV et swIAV. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études menées au laboratoire (Deblanc et al., 2021 ; Renson et al., 2017). Un des avantages des modèles d'infections expérimentales sur porcs EOPS est leur reproductibilité. En effet, les essais sur des porcs EOPS issus de la porcherie protégée de l'Anses de Ploufragan sont réalisés sur des animaux au statut sanitaire très bien maîtrisé et dans un environnement très contrôlé (biosécurité de niveau 3, vérification de la qualité de l'eau et de l'air filtré, etc.),

permettant ainsi d'éviter les biais inter-essais. Par ailleurs, cela permet aussi d'assurer une homogénéité intra-essais, aspect que nous avons pu objectiver grâce aux ellipses de nos ACP sur les données obtenues lors des mono-infections (cf chapitre 1). Ces mêmes analyses ont cependant indiqué une plus grande variabilité dans les réponses des animaux infectés successivement par les deux virus. Ceci montre bien que les porcs ont des réponses plus variables aux co/super-infections qu'aux mono-infections, ce qui pourrait expliquer, du moins en partie, les différences de résultats, voire d'interprétation des résultats, des études menées par différentes équipes sur la co/super-infection SDRPV/swIAV.

Le statut EOPS des animaux garantit de ne pas introduire de biais liés à des infections concomitantes asymptomatiques, à la différence des porcs conventionnels, mais peut questionner sur le fait que les expérimentations reflètent ou non ce qui peut se passer en élevage conventionnel. En effet, une précédente étude de super-infection SDRPV/swIAV (H1N1), montrait une exacerbation des signes cliniques chez des porcs conventionnels, contre peu de signes cliniques chez des porcs CDCD (Cesarean-derived colostrum-deprived) (Van Reeth et al., 2001). A contrario, en élevage les porcs conventionnels sont soumis à de nombreux stress (facteurs infectieux ou non, etc.) qui peuvent stimuler leur système immunitaire et modifier leurs microbiotes respiratoire et intestinal (voir partie 7). De façon intéressante, il a été montré chez la souris qu'une stimulation virale respiratoire, de type Adénovirus, induisait un entraînement immunitaire local des macrophages alvéolaires, responsable d'une meilleure protection contre une infection respiratoire subséquente à *S. pneumoniae* (Yao et al., 2018). Donc chez les porcs conventionnels, sujets à des primo-infections bactériennes ou virales (autres que swIAV et SDRPV), l'immunité entraînée pourrait avoir un impact sur le déroulé de la super-infection SDRPV/swIAV.

Le CRP ne se réduisant pas aux infections à SDRPV et swIAV, il serait intéressant de complexifier le modèle en y ajoutant une co-infection bactérienne et ainsi d'étudier, par exemple, l'effet d'une triple infection Mhp/SDRPV/swIAV. Tenant compte des précédents travaux de l'équipe, il serait opportun de réaliser une primo-infection Mhp 21 jours avant les inoculations successives SDRPV/swIAV à une semaine d'intervalle. Nous avons précédemment observé lors d'inoculations successives Mhp/swIAV, une exacerbation des signes cliniques (Deblanc et al., 2012) et une augmentation de la réponse pro-inflammatoire, comparativement aux porcs mono-infectés swIAV (Deblanc et al., 2016). Egalement une étude de la co-infection Mhp/SDRPV chez des porcs EOPS avait mis en évidence une augmentation des signes cliniques lors de cette co-infection (Bourry et al., 2015). Compte tenu de ces précédents résultats, on pourrait s'attendre à ce que les porcs triplement infectés

Mhp/SDRPV/swIAV puissent présenter une exacerbation des signes cliniques, mais ce serait à vérifier.

D'autre part, il serait intéressant d'évaluer l'interférence de l'infection à swIAV avec la vaccination à MLV-1 chez des porcs conventionnels plutôt que des porcs EOPS pour tenir compte du statut sanitaire des animaux et de leur réponse immunitaire probablement différente à l'infection à swIAV.

Outre le statut sanitaire des animaux, la voie d'inoculation des pathogènes pourrait également avoir influencé les résultats de l'étude (cf chapitre 1). A noter que la voie d'inoculation du swIAV que nous avons utilisée n'est pas une voie naturelle d'infection, laquelle a lieu via des aérosols. Il est connu que la sévérité de la grippe dépend de la voie d'inoculation des swIAV, comme cela a été observé dans notre laboratoire (résultats non publiés) et rapporté par d'autres (Van Reeth and Ma., 2013). L'inoculation intratrachéale permet de reproduire le syndrome grippal observé sur le terrain et d'induire une réponse inflammatoire pulmonaire, ce qui n'est pas le cas de l'inoculation intranasale (Van Reeth and Ma, 2013). Il serait donc intéressant, afin d'être en mesure de reproduire au mieux les réponses immunitaires de l'hôte intervenant au cours d'une infection naturelle à swIAV, de pouvoir effectuer une inoculation par nébulisation, méthode non disponible actuellement au laboratoire.

Les contributions des modèles *in vivo* en recherche et en médecine vétérinaire sont nombreuses. En effet, outre l'étude des réponses de l'animal aux infections virales, le modèle porcine reste fondamental pour les études de transmissions de pathogènes et pour la recherche en vaccinologie. Si le modèle *in vivo* est encore souvent indispensable, il présente néanmoins de nombreuses contraintes telles qu'un coût financier important. Avec l'évolution de la réglementation et de l'éthique au regard de la protection et du bien-être animal, la mise en place d'une recherche sur modèle animal est de plus en plus encadrée et restreinte. Le développement de méthodes alternatives ou complémentaires est donc indispensable et encouragé. Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons mis au point un modèle de co-culture NPTr/PAM par contact direct. Le choix de ces deux types cellulaires s'est fait en tenant compte du tropisme de chacun des virus, cellules épithéliales du tractus respiratoire pour les swIAV (Crisci et al., 2013) et PAM pour le SDRPV (Crisci et al., 2019). Bien que nos premières données (cf chapitre 2) soient concordantes avec les résultats obtenus chez le porc (cf chapitre 1), elles ne peuvent pas être directement transposables à des données expérimentales *in vivo*, car ce modèle ne prend pas en compte toute la complexité du poumon. L'utilisation de PCLS pourrait être un modèle intermédiaire entre l'*in vitro* et l'*in vivo*. Une étude réalisée par notre équipe en collaboration avec l'Unité BIOEPAR, ONIRIS, Nantes

(Saade et al., 2020) a montré des résultats concordants avec nos études *in vivo* et *in vitro*, c'est-à-dire une atténuation de la voie de l'IFN-I au cours des inoculations successives SDRPV-1h-swIAV. Si elles ne peuvent se substituer aux études *in vivo*, les études *in vitro* ou *ex vivo* peuvent avoir un intérêt pour apporter (i) des données complémentaires sur les mécanismes sous-jacents intervenants au cours de la co/super-infection SDRPV/swIAV (voies de signalisation par exemple) et (ii) des arguments quant à l'opportunité de réaliser une étude expérimentale *in vivo*.

6. Contributions de l'étude de la co/super-infection SDRPV/swIAV à une meilleure compréhension et à un meilleur contrôle du CRP

Notre étude de co-infection SDRPV/swIAV chez le porc nous a permis de compléter les connaissances pour une meilleure compréhension du CRP. Nous avons pu ainsi montrer pour la première fois (i) la capacité du SDRPV à atténuer les signes cliniques et les réponses antivirale et inflammatoire liés à l'infection à swIAV et (ii) la capacité de l'infection à swIAV à diminuer la multiplication pulmonaire du SDRPV et à induire plus rapidement la réponse à médiation cellulaire vis-à-vis du SDRPV (cf chapitre 1). Au vue de l'ensemble de ces données, il semble important de recommander aux vétérinaires, lors d'épisodes de clinique respiratoire dans les élevages, de ne pas se limiter à la recherche d'un seul pathogène, mais de réaliser un diagnostic multi-pathogènes pour ainsi aborder les infections non pas individuellement mais collectivement (Goecke et al., 2020). D'autre part, notre étude de l'impact de l'infection à swIAV sur l'efficacité de la vaccination MLV a montré que le virus grippal retardait la virémie MLV et augmentait la réponse à médiation cellulaire vis-à-vis du SDRPV après challenge (cf chapitre 3). Compte tenu de ces résultats, il paraîtrait important dans les élevages qui vaccinent les porcelets contre le SDRPV, de bien caractériser la période de circulation des swIAV afin d'éviter de vacciner contre le SDRP au moment d'une infection grippale et de limiter ainsi l'interférence que les swIAV pourraient avoir avec la vaccination MLV.

7. Impact des infections successives SDRPV/swIAV sur les microbiotes respiratoire et intestinal

Outre leurs interactions mutuelles, les agents pathogènes impliqués dans le CRP pourraient perturber le microbiote respiratoire, voire le microbiote intestinal.

Le microbiome joue un rôle important dans de nombreux processus physiologiques, grâce aux activités métaboliques des micro-organismes qui les composent et leurs interactions avec l'hôte (Marchesi and Ravel, 2015; Rogers et al., 2015). L'induction de déséquilibres dans les communautés de micro-organismes commensaux (comme la dysbiose au niveau intestinal) suite aux infections virales pourrait donc indirectement contribuer au CRP. Une étude a montré que l'infection SDRPV entraînait une diminution de la diversité du microbiote respiratoire, ainsi qu'une augmentation de la proportion de certaines bactéries du microbiote intestinal (Jiang et al., 2018). Des porcelets touchés par le CRP ont présenté une augmentation de l'abondance des populations bactériennes au niveau de l'oropharynx (Wang et al., 2018). Également, une étude sur le microbiote nasale des porcs mono-infectés H3N2 a montré la présence d'une corrélation positive entre la charge virale H3N2 et l'abondance relative de la famille des *Neisseriaceae* (Chrun et al., 2021). Chez la souris, il a été montré une réduction de la population de bactéries anaérobies au cours de l'infection à IAV, ainsi qu'une augmentation de la population de protéobactéries dans le tractus gastro-intestinal (Deriu et al., 2016). Néanmoins, chez l'Homme, le virus H3N2 ne perturbait pas le microbiote respiratoire (Ramos-Sevillano et al., 2018). A l'heure actuelle, une seule étude a analysé l'impact de la co-infection SDRPV-2/H3N2 sur le microbiote nasal du porc. Elle a montré une richesse microbienne relativement stable au cours du temps, comparativement aux porcs témoins (Chrun et al., 2021).

Ainsi, constat est fait que les connaissances quant aux impacts des mono-infections SDRPV et swIAV, et des infections successives SDRPV/swIAV, sur le microbiote respiratoire, voire le microbiote intestinal, du porc sont encore très éparses. D'autre part, l'étude des microbiotes des porcs EOPS versus ceux des porcs conventionnels pourrait sans doute apporter des explications aux différences de pathogénicité des infections SDRPV et swIAV parfois observées chez les uns et chez les autres, comme cela a précédemment été rapporté pour le virus de la peste porcine africaine (Correa-Fiz et al., 2019). Des lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés et des matières fécales ont été récoltées tout au long de l'essai expérimental de super-infection afin d'étudier l'impact des mono-infections SDRPV ou swIAV, et de la co-infection, sur les microbiotes respiratoire et intestinal. L'objectif est d'identifier la composition bactérienne des microbiotes respiratoire et intestinal par un séquençage nouvelle génération (NGS) du gène codant la région V3-V4 de l'ARN ribosomique 16S contenu dans les différents échantillons. Ces échantillons n'ont pas pu être analysés dans le cadre de cette thèse, mais leur exploitation future permettra peut-être de savoir si la co-infection SDRPV/swIAV modifie le microbiote respiratoire différemment des mono-infections.



REFERENCES

- Aasted, B., Bach, P., Nielsen, J., Lind, P., 2002. Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells and lymph node cells from piglets infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 1229-1234.
- Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M., Harrach, B., Harrison, R.L., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Mushegian, A.R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M., Gorbalenya, A.E., Davison, A.J., 2016. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). *Arch Virol* 161, 2921-2949.
- Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Harrach, B., Harrison, R.L., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Mushegian, A.R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M., Gorbalenya, A.E., Davison, A.J., 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch Virol* 162, 2505-2538.
- Ait-Ali, T., Wilson, A.D., Westcott, D.G., Clapperton, M., Waterfall, M., Mellencamp, M.A., Drew, T.W., Bishop, S.C., Archibald, A.L., 2007. Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated Swine alveolar macrophages. *Viral Immunol* 20, 105-118.
- Albina, E., 1997. [Porcine reproductive and respiratory syndrome: ten years of experience (1986-1996) with this undesirable viral infection]. *Veterinary research* 28, 305-352.
- Alkhamis, M.A., Arruda, A.G., Morrison, R.B., Perez, A.M., 2017. Novel approaches for Spatial and Molecular Surveillance of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSv) in the United States. *Sci Rep* 7, 4343.
- Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W., Osorio, F.A., 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol* 74, 10834-10837.
- Almand, E.A., Moore, M.D., Jaykus, L.A., 2017. Virus-Bacteria Interactions: An Emerging Topic in Human Infection. *Viruses* 9.
- Altenburg, A.F., Rimmelzwaan, G.F., de Vries, R.D., 2015. Virus-specific T cells as correlate of (cross-)protective immunity against influenza. *Vaccine* 33, 500-506.
- Alvarez, J., Sarradell, J., Kerkaert, B., Bandyopadhyay, D., Torremorell, M., Morrison, R., Perez, A., 2015. Association of the presence of influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sow farms with post-weaning mortality. *Preventive Veterinary Medicine* 121, 240-245.
- An, T.Q., Li, J.N., Su, C.M., Yoo, D., 2020. Molecular and Cellular Mechanisms for PRRSV Pathogenesis and Host Response to Infection. *Virus research* 286, 197980.
- Auladell, M., Jia, X., Hensen, L., Chua, B., Fox, A., Nguyen, T.H.O., Doherty, P.C., Kedzierska, K., 2019. Recalling the Future: Immunological Memory Toward Unpredictable Influenza Viruses. *Front Immunol* 10, 1400.
- Balasuriya, U.B., Carossino, M., 2017. Reproductive effects of arteriviruses: equine arteritis virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections. *Curr Opin Virol* 27, 57-70.
- Bassaganya-Riera, J., Thacker, B.J., Yu, S., Strait, E., Wannemuehler, M.J., Thacker, E.L., 2004. Impact of immunizations with porcine reproductive and respiratory syndrome virus on lymphoproliferative recall responses of CD8+ T cells. *Viral Immunol* 17, 25-37.
- Bel, M., Ocaña-Macchi, M., Liniger, M., McCullough, K.C., Matrosovich, M., Summerfield, A., 2011. Efficient sensing of avian influenza viruses by porcine plasmacytoid dendritic cells. *Viruses* 3, 312-330.
- Bentley, K., Evans, D.J., 2018. *The Journal of general virology* 99, 1345-1356.
- Berton, P., 2011. Etude retrospective 2005-2011 de programmes de stabilisation SDRP mis en place dans 19 élevages porcins. Université de Toulouse.
- Beura, L.K., Sarkar, S.N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J Virol* 84, 1574-1584.
- 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, 261-266.
- Bingaman, A.W., Patke, D.S., Mane, V.R., Ahmadzadeh, M., Ndejemi, M., Bartlett, S.T., Farber, D.L., 2005. Novel phenotypes and migratory properties distinguish memory CD4 T cell subsets in lymphoid and lung tissue. *European journal of immunology* 35, 3173-3186.

- Bordet, E., Frétaud, M., Crisci, E., Bouguyon, E., Rault, S., Pezant, J., Pleau, A., Renson, P., Giuffra, E., Larcher, T., Bourge, M., Bourry, O., Boulesteix, O., Langevin, C., Schwartz-Cornil, I., Bertho, N., 2019. Macrophage-B Cell Interactions in the Inverted Porcine Lymph Node and Their Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Front Immunol* 10, 953.
- Bordet, E., Maisonnasse, P., Renson, P., Bouguyon, E., Crisci, E., Tiret, M., Descamps, D., Bernelin-Cottet, C., Urien, C., Lefèvre, F., Jouneau, L., Bourry, O., Leplat, J.J., Schwartz-Cornil, I., Bertho, N., 2018. 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, 10172.
- Bosworth, B., Erdman, M.M., Stine, D.L., Harris, I., Irwin, C., Jens, M., Loynachan, A., Kamrud, K., Harris, D.L., 2010. Replicon particle vaccine protects swine against influenza. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 33, e99-e103.
- Bouvier, N.M., Palese, P., 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4, D49-53.
- Brockmeier, S.L., Halbur, P.G., Thacker, E.L., 2002. Porcine respiratory disease complex. Brogden, K.A., Guthmiller, J.M. (Eds.) *Polymicrobial Disease*. Washington (DC).
- Brockmeier, S.L., Loving, C.L., Eberle, K.C., Hau, S.J., Buckley, A., Van Geelen, A., Montiel, N.A., Nicholson, T., Lager, K.M., 2017. Interferon alpha inhibits replication of a live-attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine preventing development of an adaptive immune response in swine. *Veterinary microbiology* 212, 48-51.
- Brockmeier, S.L., Loving, C.L., Vorwald, A.C., Kehrli, M.E., Jr., Baker, R.B., Nicholson, T.L., Lager, K.M., Miller, L.C., Faaberg, K.S., 2012. Genomic sequence and virulence comparison of four Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains. *Virus research* 169, 212-221.
- Brockmeier, S.L., Palmer, M.V., Bolin, S.R., 2000. Effects of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Bordetella bronchiseptica*, or a combination of both organisms in pigs. *American journal of veterinary research* 61, 892-899.
- Brown, I.H., Harris, P.A., McCauley, J.W., Alexander, D.J., 1998. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *The Journal of general virology* 79 (Pt 12), 2947-2955.
- 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.
- Bui, M., Whittaker, G., Helenius, A., 1996. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol* 70, 8391-8401.
- Burkard, C., Lilloco, S.G., Reid, E., Jackson, B., Mileham, A.J., Ait-Ali, T., Whitelaw, C.B., Archibald, A.L., 2017. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathog* 13, e1006206.
- 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, 81-108.
- Cador, C., Andraud, M., Willem, L., Rose, N., 2017. Control of endemic swine flu persistence in farrow-to-finish pig farms: a stochastic metapopulation modeling assessment. *Veterinary research* 48, 58.
- Cador, C., Hervé, S., Andraud, M., Gorin, S., Paboeuf, F., Barbier, N., Quéguiner, S., Deblanc, C., Simon, G., Rose, N., 2016. Maternally-derived antibodies do not prevent transmission of swine influenza A virus between pigs. *Veterinary research* 47, 86.
- Calvert, J.G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G., Welch, S.K., 2007. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol* 81, 7371-7379.
- 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, 261-269.

- Chakrabarti, A.K., Pasricha, G., 2013. An insight into the PB1F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses. *Virology* 440, 97-104.
- Chamba Pardo, F.O., Schelkopf, A., Allerson, M., Morrison, R., Culhane, M., Perez, A., Torremorell, M., 2018. Breed-to-wean farm factors associated with influenza A virus infection in piglets at weaning. *Prev Vet Med* 161, 33-40.
- Chang, C.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Harmon, K.M., Dixon, P.M., Dvorak, C.M., Murtaugh, M.P., 2002. Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. *J Virol* 76, 4750-4763.
- Chang, H.C., Peng, Y.T., Chang, H.L., 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, 281-293.
- Charentantanakul, W., 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World journal of virology* 1, 23-30.
- Chastagner, A., Bonin, E., Fablet, C., Quéguiner, S., Hirchaud, E., Lucas, P., Gorin, S., Barbier, N., Béven, V., Garin, E., Blanchard, Y., Rose, N., Hervé, S., Simon, G., 2019a. Virus persistence in pig herds led to successive reassortment events between swine and human influenza A viruses, resulting in the emergence of a novel triple-reassortant swine influenza virus. *Veterinary research* 50, 77.
- Chastagner, A., Enouf, V., Peroz, D., Herve, S., Lucas, P., Queguiner, S., Gorin, S., Beven, V., Behillil, S., Leneveu, P., Garin, E., Blanchard, Y., van der Werf, S., Simon, G., 2019b. Bidirectional Human-Swine Transmission of Seasonal Influenza A(H1N1)pdm09 Virus in Pig Herd, France, 2018. *Emerg Infect Dis* 25, 1940-1943.
- Chastagner, A., Hervé, S., Bonin, E., Quéguiner, S., Hirchaud, E., Henritzi, D., Béven, V., Gorin, S., Barbier, N., Blanchard, Y., Simon, G., 2018. Spatiotemporal Distribution and Evolution of the A/H1N1 2009 Pandemic Influenza Virus in Pigs in France from 2009 to 2017: Identification of a Potential Swine-Specific Lineage. *J Virol* 92.
- Chastagner, A., Hervé, S., Quéguiner, S., Hirchaud, E., Lucas, P., Gorin, S., Béven, V., Barbier, N., Deblanc, C., Blanchard, Y., Simon, G., 2020. Genetic and Antigenic Evolution of European Swine Influenza A Viruses of HA-1C (Avian-Like) and HA-1B (Human-Like) Lineages in France from 2000 to 2018. *Viruses* 12.
- Chaudhari, J., Vu, H.L.X., 2020. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Reverse Genetics and the Major Applications. *Viruses* 12.
- Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Fang, Y., 2010. Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology* 398, 87-97.
- Cheung, T.K., Poon, L.L., 2007. Biology of influenza a virus. *Ann N Y Acad Sci* 1102, 1-25.
- Chiapponi, C., Ebranati, E., Pariani, E., Faccini, S., Luppi, A., Baioni, L., Manfredi, R., Carta, V., Merenda, M., Affanni, P., Colucci, M.E., Veronesi, L., Zehender, G., Foni, E., 2018. Genetic analysis of human and swine influenza A viruses isolated in Northern Italy during 2010-2015. *Zoonoses Public Health* 65, 114-123.
- Cho, J.G., Dee, S.A., 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 66, 655-662.
- Cho, J.G., Dee, S.A., Deen, J., Trincado, C., Fano, E., Jiang, Y., Faaberg, K., Murtaugh, M.P., Guedes, A., Collins, J.E., Joo, H.S., 2006. The impact of animal age, bacterial coinfection, and isolate pathogenicity on the shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols from experimentally infected pigs. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 70, 297-301.
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S., 2003. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J* 44, 735-737.
- Choi, Y.K., Lee, J.H., Erickson, G., Goyal, S.M., Joo, H.S., Webster, R.G., Webby, R.J., 2004. H3N2 influenza virus transmission from swine to turkeys, United States. *Emerg Infect Dis* 10, 2156-2160.
- Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D.a.C., 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. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 117-126.
- Corzo, C.A., Culhane, M., Dee, S., Morrison, R.B., Torremorell, M., 2013. Airborne detection and quantification of swine influenza A virus in air samples collected inside, outside and downwind from swine barns. *PLoS one* 8, e71444.
- 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, 46.
- Crisci, E., Fraile, L., Montoya, M., 2019. Cellular Innate Immunity against PRRSV and Swine Influenza Viruses. *Vet Sci* 6.
- Crisci, E., Mussa, T., Fraile, L., Montoya, M., 2013. Review: influenza virus in pigs. *Mol Immunol* 55, 200-211.
- Czyżewska-Dors, E., Dors, A., Kwit, K., Stasiak, E., Pomorska-Mól, M., 2017. Pig lung immune cytokine response to the swine influenza virus and the *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Journal of Veterinary Research* 61, 259-265.
- Czyżewska-Dors, E., Pomorska-Mól, M., Dors, A., Pluta, A., Podgórska, K., Kwit, K., Stasiak, E., Lukomska, A., 2019. Proinflammatory cytokine changes in bronchoalveolar lavage fluid cells isolated from pigs infected solely with porcine reproductive and respiratory syndrome virus or co-infected with swine influenza virus. *Journal of Veterinary Research* 63, 489-495.
- Darwich, L., Díaz, I., Mateu, E., 2010. Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus research* 154, 123-132.
- Deblanc, C., Delgado-Ortega, M., Gorin, S., Berri, M., Paboeuf, F., Berthon, P., Herrler, G., Meurens, F., Simon, G., 2016. *Mycoplasma hyopneumoniae* does not affect the interferon-related antiviral response but predisposes the pig to a higher level of inflammation following swine influenza virus infection. *The Journal of general virology* 97, 2501-2515.
- Deblanc, C., Gorin, S., Quéguiner, S., Gautier-Bouchardon, A.V., Ferré, S., Amenna, N., Cariolet, R., Simon, G., 2012. Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* modifies outcomes of infection with European swine influenza virus of H1N1, but not H1N2, subtype. *Veterinary microbiology* 157, 96-105.
- Deblanc, C., Hervé, S., Gorin, S., Cador, C., Andraud, M., Quéguiner, S., Barbier, N., Paboeuf, F., Rose, N., Simon, G., 2018. Maternally-derived antibodies do not inhibit swine influenza virus replication in piglets but decrease excreted virus infectivity and impair post-infectious immune responses. *Veterinary microbiology* 216, 142-152.
- Deblanc, C., Quéguiner, S., Gorin, S., Chastagner, A., Hervé, S., Paboeuf, F., Simon, G., 2020. Evaluation of the Pathogenicity and the Escape from Vaccine Protection of a New Antigenic Variant Derived from the European Human-Like Reassortant Swine H1N2 Influenza Virus. *Viruses* 12.
- Deblanc, C., Simon, G., 2017. Les virus influenza de type A dans le complexe respiratoire porcin. *Virologie* 21, 225-238.
- Dee, S.A., Molitor, T.W., 1998. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using a test and removal process. *The Veterinary record* 143, 474-476.
- Dee, S.A., Molitor, T.W., Rossow, K.D., 2000. Epidemiological and diagnostic observations following the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a breeding herd of pigs by the test and removal protocol. *The Veterinary record* 146, 211-213.
- Delgado-Ortega, M., Melo, S., Punyadarsaniya, D., Rame, C., Olivier, M., Soubieux, D., Marc, D., Simon, G., Herrler, G., Berri, M., Dupont, J., Meurens, F., 2014. Innate immune response to a H3N2 subtype swine influenza virus in newborn porcine trachea cells, alveolar macrophages, and precision-cut lung slices. *Veterinary research* 45, 42.
- 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. *The Journal of general virology* 86, 1441-1445.
- Delputte, P.L., Meerts, P., Costers, S., Nauwynck, H.J., 2004. Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. *Veterinary immunology and immunopathology* 102, 179-188.
- De Vleeschauwer, A., Van Poucke, S., Braeckmans, D., Van Doorsselaere, J., Van Reeth, K.,

2009. Efficient transmission of swine-adapted but not wholly avian influenza viruses among pigs and from pigs to ferrets. *The Journal of infectious diseases* 200, 1884-1892.
- Dewey, C., Charbonneau, G., Carman, S., Hamel, A., Nayar, G., Friendship, R., Eernisse, K., Swenson, S., 2000. Lelystad-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) identified in Canadian swine. *Can Vet J* 41, 493-494.
- Dlugolenski, D., Jones, L., Howerth, E., Wentworth, D., Tompkins, S.M., Tripp, R.A., 2015. Swine Influenza Virus PA and Neuraminidase Gene Reassortment into Human H1N1 Influenza Virus Is Associated with an Altered Pathogenic Phenotype Linked to Increased MIP-2 Expression. *J Virol* 89, 5651-5667.
- Dobrescu, I., Levast, B., Lai, K., Delgado-Ortega, M., Walker, S., Banman, S., Townsend, H., Simon, G., Zhou, Y., Gerdtts, V., Meurens, F., 2014. In vitro and ex vivo analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Veterinary microbiology* 169, 18-32.
- Dokland, T., 2010. The structural biology of PRRSV. *Virus research* 154, 86-97.
- Dommergues, L., Garin, E., Rose, N., Wendling, S., Lecarpentier, L., Toulouse, O., Grasteau, A., Dupuy, C., Carles, S., Simon, G., Hervé, S., 2020. Réseau national de surveillance des virus influenza A chez le porc en France métropolitaine, rapport d'activité 2017-2019, Plateforme ESA.
- Dommergues, L., Garin, E., Rose, N., Wendling, S., Lecarpentier, L., Toulouse, O., Grasteau, A., Dupuy, C., Carles, S., Simon, G., Hervé, S., 2021. Rapport d'activité 2020 : Réseau national de surveillance des virus influenza A chez le porc en France métropolitaine., Veille sanitaire internationale - Plateforme ESA.
- Dong, V.H., Tu, P.-Y., Tsai, P.-C., Lin, Y.-H., Chang, H.-L., Kuo, T.-Y., Chiou, M.-T., Lin, C.-N., Chung, W.-B., 2015. Expression of Toll-like receptor signaling-related genes in pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Research in veterinary science* 101, 180-186.
- Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., Daniels, R., 2018. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front Immunol* 9, 1581.
- Du, Y., Qi, J., Lu, Y., Wu, J., Yoo, D., Liu, X., Zhang, X., Li, J., Sun, W., Cong, X., Shi, J., Wang, J., 2012. Evaluation of a DNA vaccine candidate co-expressing GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) with interferon α/γ in immediate and long-lasting protection against HP-PRRSV challenge. *Virus genes* 45, 474-487.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1997. 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, 2483-2497.
- Dubin, R.F., Robinson, S.K., Widdicombe, J.H., 2004. Secretion of lactoferrin and lysozyme by cultures of human airway epithelium. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 286, L750-755.
- Eclercy, J., Renson, P., Hirchaud, E., Andraud, M., Beven, V., Paboeuf, F., Rose, N., Blanchard, Y., Bourry, O., 2021. Phenotypic and Genetic Evolutions of a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Modified Live Vaccine after Limited Passages in Pigs. *Vaccines* 9.
- Eclercy, J., Renson, P., Leuret, A., Hirchaud, E., Normand, V., Andraud, M., Paboeuf, F., Blanchard, Y., Rose, N., Bourry, O., 2019. A Field Recombinant Strain Derived from Two Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) Modified Live Vaccines Shows Increased Viremia and Transmission in SPF Pigs. *Viruses* 11.
- Edmans, M., McNee, A., Porter, E., Vatzia, E., Paudyal, B., Martini, V., Gubbins, S., Francis, O., Harley, R., Thomas, A., Burt, R., Morgan, S., Fuller, A., Sewell, A., Charleston, B., Bailey, M., Tchilian, E., 2020. Magnitude and Kinetics of T Cell and Antibody Responses During H1N1pdm09 Infection in Inbred Babraham Pigs and Outbred Pigs. *Front Immunol* 11, 604913.
- Erdman, M.M., Kamrud, K.I., Harris, D.L., Smith, J., 2010. Alphavirus replicon particle vaccines developed for use in humans induce high levels of antibodies to influenza virus hemagglutinin in swine: proof of concept. *Vaccine* 28, 594-596.
- Ermund, A., Meiss, L.N., Rodriguez-Pineiro, A.M., Bähr, A., Nilsson, H.E., Trillo-Muyo, S., Ridley, C., Thornton, D.J., Wine, J.J., Hebert, H., Klymiuk, N., Hansson, G.C., 2017. The normal

- trachea is cleaned by MUC5B mucin bundles from the submucosal glands coated with the MUC5AC mucin. *Biochemical and biophysical research communications* 492, 331-337.
- Everett, H.E., Aramouni, M., Coward, V., Ramsay, A., Kelly, M., Morgan, S., Tchilian, E., Canini, L., Woolhouse, M.E.J., Gilbert, S., Charleston, B., Brown, I.H., Brookes, S.M., 2019. Vaccine-mediated protection of pigs against infection with pandemic H1N1 2009 swine influenza A virus requires a close antigenic match between the vaccine antigen and challenge virus. *Vaccine* 37, 2288-2293.
- Fablet, 2009. Protéines de la phase aiguë de l'inflammation chez le porc : Intérêt en santé animale et en santé publique vétérinaire. *Revue Méd. Vét.*
- Fablet, C., Marois-Crehan, C., Grasland, B., Simon, G., Rose, N., 2016a. Factors associated with herd-level PRRSV infection and age-time to seroconversion in farrow-to-finish herds. *Veterinary microbiology* 192, 10-20.
- Fablet, C., Marois-Créhan, C., Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N., 2012a. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. *Veterinary microbiology* 157, 152-163.
- Fablet, C., Marois, C., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J.P., Le Devendec, L., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N., 2012b. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Research in veterinary science* 93, 627-630.
- Fablet, C., Marois, C., Kuntz-Simon, G., Rose, N., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J.P., Le Devendec, L., Tocqueville, V., Queguiner, S., Gorin, S., Kobisch, M., Madec, F., 2011. Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Veterinary microbiology* 147, 329-339.
- Fablet, C., Renson, P., Eono, F., Mahe, S., Eveno, E., Le Dimna, M., Normand, V., Lebret, A., Rose, N., Bourry, O., 2016b. Maternally-derived antibodies (MDAs) impair piglets' humoral and cellular immune responses to vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Veterinary microbiology* 192, 175-180.
- Fan, P., Wei, Y., Guo, L., Wu, H., Huang, L., Liu, J., Liu, C., 2013. Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Virology Journal* 10, 265.
- Fan, X., Hashem, A.M., Chen, Z., Li, C., Doyle, T., Zhang, Y., Yi, Y., Farnsworth, A., Xu, K., Li, Z., He, R., Li, X., Wang, J., 2015. Targeting the HA2 subunit of influenza A virus hemagglutinin via CD40L provides universal protection against diverse subtypes. *Mucosal Immunol* 8, 211-220.
- Fang, Y., Kim, D.Y., Ropp, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Rowland, R.R., 2004. Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. *Virus research* 100, 229-235.
- Fernandez Gonzalez, S., Jayasekera, J.P., Carroll, M.C., 2008. Complement and natural antibody are required in the long-term memory response to influenza virus. *Vaccine* 26 Suppl 8, 186-93.
- Firth, A.E., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Wills, N.M., Go, Y.Y., Balasuriya, U.B.R., Atkins, J.F., Snijder, E.J., 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, 1097-1106.
- Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarías, M., Segalés, J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 184, 326-333.
- Frydas, I.S., Trus, I., Kvisgaard, L.K., Bonckaert, C., Reddy, V.R., Li, Y., Larsen, L.E., 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, 37.
- Gagnon, C.A., Spearman, G., Hamel, A., Godson, D.L., Fortin, A., Fontaine, G., Tremblay, D., 2009. Characterization of a Canadian mink H3N2 influenza A virus isolate genetically related to triple reassortant swine influenza virus. *J Clin Microbiol* 47, 796-799.
- Galina, L., Pijoan, C., Sitjar, M., Christianson, W.T., Rossow, K., Collins, J.E., 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *The Veterinary record* 134, 60-64.

- Ganesan, S., Comstock, A.T., Sajjan, U.S., 2013. Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue barriers* 1, e24997.
- Garin, E., Hervé, S., Rose, N., Locatelli, C., Ngwa-Mbot, D., Wendling, S., Bournez, L., Calavas, D., Simon, G., 2016. Réseau national de surveillance des virus influenza A chez le Porc (Résavip) – Bilan de la surveillance menée en 2015
- [French network for the surveillance of influenza A viruses in pigs (Résavip) - Results of the surveillance carried out in 2015]. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 75, 16-19.
- Genini, S., Delputte, P.L., Malinverni, R., Cecere, M., Stella, A., Nauwynck, H.J., Giuffra, E., 2008. Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Journal of general virology* 89, 2550-2564.
- Gorres, J.P., Lager, K.M., Kong, W.P., Royals, M., Todd, J.P., Vincent, A.L., Wei, C.J., Loving, C.L., Zanella, E.L., Janke, B., Kehrl, M.E., Jr., Nabel, G.J., Rao, S.S., 2011. DNA vaccination elicits protective immune responses against pandemic and classic swine influenza viruses in pigs. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 18, 1987-1995.
- Gray, G.C., Kayali, G., 2009. Facing pandemic influenza threats: the importance of including poultry and swine workers in preparedness plans. *Poultry science* 88, 880-884.
- Guthmiller, J., Utset, H., Wilson, P., 2021. B Cell Responses against Influenza Viruses: Short-Lived Humoral Immunity against a Life-Long Threat. *Viruses*.
- Haden, C., Painter, T., Fangman, T., Holtkamp, D., 2002. Assessing production parameters and economic impact of swine influenza, PRRS and *Mycoplasma hyopneumoniae* on finishing pigs in a large production system AASV Annu Meet 75-6.
- Han, C.W., Jeong, M.S., Jang, S.B., 2019. Structure and Function of the Influenza A Virus Non-Structural Protein 1. *Journal of microbiology and biotechnology* 29, 1184-1192.
- Han, M., Yoo, D., 2014. Modulation of innate immune signaling by nonstructural protein 1 (nsp1) in the family Arteriviridae. *Virus research* 194, 100-109.
- Hao, W., Wang, L., Li, S., 2020. Roles of the Non-Structural Proteins of Influenza A Virus. *Pathogens* 9.
- Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S., 2001. Experimental Reproduction of Severe Disease in CD/CD Pigs Concurrently Infected with Type 2 Porcine Circovirus and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary Pathology* 38, 528-539.
- Heinen, P.P., de Boer-Luijtzte, E.A., Bianchi, A.T.J., 2001. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. *The Journal of general virology* 82, 2697-2707.
- Heinen, P.P., van Nieuwstadt, A.P., Pol, J.M., de Boer-Luijtzte, E.A., van Oirschot, J.T., Bianchi, A.T., 2000. Systemic and mucosal isotype-specific antibody responses in pigs to experimental influenza virus infection. *Viral Immunol* 13, 237-247.
- Henningson, J.N., Rajao, D.S., Kitikoon, P., Lorusso, A., Culhane, M.R., Lewis, N.S., Anderson, T.K., Vincent, A.L., 2015. Comparative virulence of wild-type H1N1pdm09 influenza A isolates in swine. *Veterinary microbiology* 176, 40-49.
- 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, 7-16.
- Hervé, S., Chastagner, A., Quéguiner, S., Barbier, N., Gorin, S., Blanchard, Y., Rose, N., Jardin, A., Dommergues, L., Simon, G., 2021. Diffusion en 2020, dans les élevages de porcs du nord-ouest de la France, d'un virus influenza porcin H1AVN2 d'un genotype nouvellement introduit en Bretagne *Bulletin Epidémiologique, Santé Animale et Alimentation* Parution Anticipée.
- Hervé, S., Garin, E., Calavas, D., Lecarpentier, L., Ngwa-Mbot, D., Poliak, S., Wendling, S., Rose, N., Simon, G., 2019. Virological and epidemiological patterns of swine influenza A virus infections in France: Cumulative data from the RESAVIP surveillance network, 2011-2018. *Veterinary microbiology* 239, 108477.

- Hill, H., 1990. Overview and history of mystery swine disease (swine infertility and respiratory syndrome), in: Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee meeting. Livestock Conservation Institute, Madison, WI, 29–30.
- Hillaire, M.L., van Eijk, M., van Trierum, S.E., van Riel, D., Saelens, X., Romijn, R.A., Hemrika, W., Fouchier, R.A., Kuiken, T., Osterhaus, A.D., Haagsman, H.P., Rimmelzwaan, G.F., 2011. Assessment of the antiviral properties of recombinant porcine SP-D against various influenza A viruses in vitro. *PLoS one* 6, e25005.
- Hipra, 2015. The book for PRRS knowledge. The Reference in Prevention for ANimal Health.
- Hu, Y., Sneyd, H., Dekant, R., Wang, J., 2017. Influenza A Virus Nucleoprotein: A Highly Conserved Multi-Functional Viral Protein as a Hot Antiviral Drug Target. *Current topics in medicinal chemistry* 17, 2271-2285.
- Hui-Wen Changa, Chian-Ren Jenga, Juan J. Liua, Tsang-Long Linc, Chih-Cheng Changd, Mi-Yuan Chiaa, Yi-Chieh Tsaia, Victor F. Panga, 2005. Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolarmacrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon- α . *Veterinary microbiology*.
- Hutchinson, E.C., Denham, E.M., Thomas, B., Trudgian, D.C., Hester, S.S., Ridlova, G., York, A., Turrell, L., Fodor, E., 2012. Mapping the phosphoproteome of influenza A and B viruses by mass spectrometry. *PLoS Pathog* 8, e1002993.
- Jagger, B.W., Wise, H.M., Kash, J.C., Walters, K.A., Wills, N.M., Xiao, Y.L., Dunfee, R.L., Schwartzman, L.M., Ozinsky, A., Bell, G.L., Dalton, R.M., Lo, A., Efstathiou, S., Atkins, J.F., Firth, A.E., Taubenberger, J.K., Digard, P., 2012. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* 337, 199-204.
- Janke, B.H., 2014. Influenza A virus infections in swine: pathogenesis and diagnosis. *Vet Pathol* 51, 410-426.
- Jayasekera, J.P., Moseman, E.A., Carroll, M.C., 2007. Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *J Virol* 81, 3487-3494.
- 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, 156-158.
- Jiang, W., Jiang, P., Wang, X., Li, Y., Du, Y., Wang, X., 2008. Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/or GP4 of PRRS virus. *Virus research* 136, 50-57.
- Jiang, Y., Fang, L., Xiao, S., Li, B., Pan, Y., Luo, R., Chen, H., 2009. A suicidal DNA vaccine co-expressing two major membrane-associated proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigens induce protective responses. *Biotechnology letters* 31, 509-518.
- Jiang, Y.F., Xia, T.Q., Zhou, Y.J., Yu, L.X., Yang, S., Huang, Q.F., Li, L.W., Gao, F., Qu, Z.H., Tong, W., Tong, G.Z., 2015. Characterization of three porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from a single swine farm bearing strong homology to a vaccine strain. *Veterinary microbiology* 179, 242-249.
- Judge, E.P., Hughes, J.M., Egan, J.J., Maguire, M., Molloy, E.L., O'Dea, S., 2014. Anatomy and bronchoscopy of the porcine lung. A model for translational respiratory medicine. *Am J Respir Cell Mol Biol* 51, 334-343.
- Karlsson, I., Borggren, M., Rosenstjerne, M.W., Trebbien, R., Williams, J.A., Vidal, E., Vergara-Alert, J., Foz, D.S., Darji, A., Sisteré-Oró, M., Segalés, J., Nielsen, J., Fomsgaard, A., 2018. Protective effect of a polyvalent influenza DNA vaccine in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology* 195, 25-32.
- Kay, R.M., Done, S.H., Paton, D.J., 1994. Effect of sequential porcine reproductive and respiratory syndrome and swine influenza on the growth and performance of finishing pigs. *The Veterinary record* 135, 199-204.
- Ke, H., Yoo, D., 2017. The viral innate immune antagonism and an alternative vaccine design for PRRS virus. *Veterinary microbiology* 209, 75-89.
- Khaperskyy, D.A., Schmalings, S., Larkins-Ford, J., McCormick, C., Gaglia, M.M., 2016. Selective Degradation of Host RNA Polymerase II Transcripts by Influenza A Virus PA-X Host Shutoff Protein. *PLoS Pathog* 12, e1005427.

- Khatri, M., Dwivedi, V., Krakowka, S., Manickam, C., Ali, A., Wang, L., Qin, Z., Renukaradhya, G.J., Lee, C.W., 2010. Swine influenza H1N1 virus induces acute inflammatory immune responses in pig lungs: a potential animal model for human H1N1 influenza virus. *J Virol* 84, 11210-11218.
- Kim, H., Kim, H.K., Jung, J.H., Choi, Y.J., Kim, J., Um, C.G., Hyun, S.B., Shin, S., Lee, B., Jang, G., Kang, B.K., Moon, H.J., Song, D.S., 2011. The assessment of efficacy of porcine reproductive respiratory syndrome virus inactivated vaccine based on the viral quantity and inactivation methods. *Virology* 8, 323.
- Kim, H., Webster, R.G., Webby, R.J., 2018. Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunol* 31, 174-183.
- Kim, H.M., Lee, Y.W., Lee, K.J., Kim, H.S., Cho, S.W., van Rooijen, N., Guan, Y., Seo, S.H., 2008. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. *J Virol* 82, 4265-4274.
- 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, 689-696.
- Kim, J., Chung, H.K., Chae, C., 2003. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal* 166, 251-256.
- Kitikoon, P., Nilubol, D., Erickson, B.J., Janke, B.H., Hoover, T.C., Sornsen, S.A., Thacker, E.L., 2006. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Veterinary immunology and immunopathology* 112, 117-128.
- Kitikoon, P., Strait, E.L., Thacker, E.L., 2008. The antibody responses to swine influenza virus (SIV) recombinant matrix 1 (rM1), matrix 2 (M2), and hemagglutinin (HA) proteins in pigs with different SIV exposure. *Veterinary microbiology* 126, 51-62.
- Kitikoon, P., Vincent, A.L., Jones, K.R., Nilubol, D., Yu, S., Janke, B.H., Thacker, B.J., Thacker, E.L., 2009. Vaccine efficacy and immune response to swine influenza virus challenge in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the time of SIV vaccination. *Veterinary microbiology* 139, 235-244.
- Klinge, K.L., Vaughn, E.M., Roof, M.B., Bautista, E.M., Murtaugh, M.P., 2009. *Virology* 6, 177.
- Koçer, Z.A., Jones, J.C., Webster, R.G., 2013. Emergence of Influenza Viruses and Crossing the Species Barrier. *Microbiology spectrum* 1
- Koen, J., 1919. A practical method for field diagnoses of swine diseases. *Am J Vet Med* 14:468-70.
- Kothalawala, H., Toussaint, M.J., Gruys, E., 2006. An overview of swine influenza. *The veterinary quarterly* 28, 46-53.
- Kowalczyk, A., Pomorska-Mol, M., Kwit, K., Pejsak, Z., Rachubik, J., Markowska-Daniel, I., 2014. Cytokine and chemokine mRNA expression profiles in BALF cells isolated from pigs single infected or co-infected with swine influenza virus and *Bordetella bronchiseptica*. *Veterinary microbiology* 170, 206-212.
- Krammer, F., Fouchier, R.A.M., Eichelberger, M.C., Webby, R.J., Shaw-Saliba, K., Wan, H., Wilson, P.C., Compans, R.W., Skountzou, I., Monto, A.S., 2018a. NAction! How Can Neuraminidase-Based Immunity Contribute to Better Influenza Virus Vaccines? *mBio* 9.
- Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P.C., Palese, P., Shaw, M.L., Treanor, J., Webster, R.G., García-Sastre, A., 2018b. Influenza. *Nature reviews. Disease primers* 4, 3.
- Kreijtz, J.H., Fouchier, R.A., Rimmelzwaan, G.F., 2011. Immune responses to influenza virus infection. *Virus research* 162, 19-30.
- Krimmling, T., Schwegmann-Wessels, C., 2017. Comparison of mono- and co-infection by swine influenza A viruses and porcine respiratory coronavirus in porcine precision-cut lung slices. *Research in veterinary science* 115, 470-477.
- Kumar, N., Sharma, S., Barua, S., Tripathi, B.N., Rouse, B.T., 2018. Virological and Immunological Outcomes of Coinfections. *Clin Microbiol Rev* 31.
- Landolt, G.A., Karasin, A.I., Phillips, L., Olsen, C.W., 2003. Comparison of the pathogenesis of two genetically different H3N2 influenza A viruses in pigs. *J Clin Microbiol* 41, 1936-1941.

- Lanza, I., Brown, I.H., Paton, D.J., 1992. Pathogenicity of concurrent infection of pigs with porcine respiratory coronavirus and swine influenza virus. *Research in veterinary science* 53, 309-314.
- Larsen, D.L., Karasin, A., Zuckermann, F., Olsen, C.W., 2000. Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Veterinary microbiology* 74, 117-131.
- Le Boudier, Mandouri, Menier, Lejal, Rouas-Freiss, Riteau, 2010. Un point sur la pathogénicité des virus influenza : rôle des protéases et de la molécule immunosuppressive HLA-G. *Virologie* 14 (3) : 185-92.
- Lee, C., Kim, H., Kang, B., Yeom, M., Han, S., Moon, H., Park, S., Kim, H., Song, D., 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, 225-230.
- Li, X., Galliher-Beckley, A., Pappan, L., Tribble, B., Kerrigan, M., Beck, A., Hesse, R., Blecha, F., Nietfeld, J.C., Rowland, R.R., Shi, J., 2014. Comparison of host immune responses to homologous and heterologous type II porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) challenge in vaccinated and unvaccinated pigs. *Biomed Res Int* 2014, 416727.
- Li, Z., He, Y., Xu, X., Leng, X., Li, S., Wen, Y., Wang, F., Xia, M., Cheng, S., Wu, H., 2016. Pathological and immunological characteristics of piglets infected experimentally with a HP-PRRSV TJ strain. *BMC Vet Res* 12, 230.
- Linhares, 2013. Evaluation of immune management strategies to control and eliminate porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) Minneapolis: University of Minnesota.
- Linhares, D.C., Johnson, C., Morrison, R.B., 2015. Economic Analysis of Immunization Strategies for PRRS Control [corrected]. *PLoS one* 10, e0144265.
- Liu, C.H., Chaung, H.C., Chang, H.L., Peng, Y.T., Chung, W.B., 2009. Expression of Toll-like receptor mRNA and cytokines in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary microbiology* 136, 266-276.
- 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. *Dev Comp Immunol* 65, 245-252.
- Loeffen, W.L., Heinen, P.P., Bianchi, A.T., Hunneman, W.A., Verheijden, J.H., 2003. Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. *Veterinary immunology and immunopathology* 92, 23-35.
- Lohse, L., Nielsen, J., Eriksen, L., 2004. Temporary CD8+ T-cell depletion in pigs does not exacerbate infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Viral Immunol* 17, 594-603.
- Londrigan, S.L., Short, K.R., Ma, J., Gillespie, L., Rockman, S.P., Brooks, A.G., Reading, P.C., 2015. Infection of Mouse Macrophages by Seasonal Influenza Viruses Can Be Restricted at the Level of Virus Entry and at a Late Stage in the Virus Life Cycle. *J Virol* 89, 12319-12329.
- Loosli, C.G., 1968. Synergism between respiratory viruses and bacteria. *The Yale journal of biology and medicine* 40, 522-540.
- 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, 269-275.
- Lorusso, A., Ciacci-Zanella, J.R., Zanella, E.L., Pena, L., Perez, D.R., Lager, K.M., Rajão, D.S., Loving, C.L., Kitikoon, P., Vincent, A.L., 2014. Polymorphisms in the haemagglutinin gene influenced the viral shedding of pandemic 2009 influenza virus in swine. *The Journal of general virology* 95, 2618-2626.
- 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, 1-14.
- 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, 129-154.
- Lyoo, K.S., Kim, J.K., Jung, K., Kang, B.K., Song, D., 2014. Comparative pathology of pigs infected with Korean H1N1, H1N2, or H3N2 swine influenza A viruses. *Virol J* 11, 170.

- Ma, J., Ma, L., Yang, M., Wu, W., Feng, W., Chen, Z., 2021. The Function of the PRRSV–Host Interactions and Their Effects on Viral Replication and Propagation in Antiviral Strategies. *Vaccines* 9, 364.
- Ma, W., 2020. Swine influenza virus: Current status and challenge. *Virus research* 288.
- Madec, F., Gourreau, J.M., Kaiser, C., Le Dantec, J., Vannier, P., Aymard, M., 1985. [The persistence of activity of H1N1 (swine) influenza virus in pig breeding units during non-epidemic phases]. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 8, 247-258.
- Mair, K.H., Stadler, M., Talker, S.C., Forberg, H., Storset, A.K., Müllebnner, A., Duvigneau, J.C., Hammer, S.E., Saalmüller, A., Gerner, W., 2016. Porcine CD3(+)NKp46(+) Lymphocytes Have NK-Cell Characteristics and Are Present in Increased Frequencies in the Lungs of Influenza-Infected Animals. *Front Immunol* 7, 263.
- Maisonnette, P., Bouguyon, E., Piton, G., Ezquerro, A., Urien, C., Deloizy, C., Bourge, M., Leplat, J.J., Simon, G., Chevalier, C., Vincent-Naulleau, S., Crisci, E., Montoya, M., Schwartz-Cornil, I., Bertho, N., 2016. The respiratory DC/macrophage network at steady-state and upon influenza infection in the swine biomedical model. *Mucosal Immunol* 9, 835-849.
- Mancera Gracia, J.C., Pearce, D.S., Masic, A., Balasch, M., 2020. Influenza A Virus in Swine: Epidemiology, Challenges and Vaccination Strategies. *Frontiers in Veterinary Science* 7.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., Porgador, A., 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055-1060.
- Mänz, B., Brunotte, L., Reuther, P., Schwemmler, M., 2012. Adaptive mutations in NEP compensate for defective H5N1 RNA replication in cultured human cells. *Nat Commun* 3, 802.
- Marcelletti, J.F., Katz, D.H., 1996. IL-10 stimulates murine antigen-driven antibody responses in vitro by regulating helper cell subset participation. *Cellular immunology* 167, 86-98.
- Marcus, P.I., 1977. Intrinsic interference: non-interferon mediated viral interference. *Texas reports on biology and medicine* 35, 336-342.
- Markowska-Daniel, I., Pomorska-Mól, M., Pejsak, Z., 2011. The influence of age and maternal antibodies on the postvaccinal response against swine influenza viruses in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology* 142, 81-86.
- Martelli, P., Gozio, S., Ferrari, L., Rosina, S., De Angelis, E., Quintavalla, C., Bottarelli, E., 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, 3788-3799.
- Martínez-Lobo, F.J., Díez-Fuertes, F., Segalés, J., García-Artiga, C., Simarro, I., Castro, J.M., Prieto, C., 2011. Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model. *Veterinary microbiology* 154, 58-68.
- Martínez, J., Peris, B., Gómez, E.A., Corpa, J.M., 2009. The relationship between infectious and non-infectious herd factors with pneumonia at slaughter and productive parameters in fattening pigs. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 179, 240-246.
- Mastin, A., Alarcon, P., Pfeiffer, D., Wood, J., Williamson, S., Brown, I., Wieland, B., 2011. Prevalence and risk factors for swine influenza virus infection in the English pig population. *PLoS currents* 3, Rrn1209.
- McCullers, J.A., 2014. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 252-262.
- McKellar, J., Rebendenne, A., Wencker, M., Moncorgé, O., Goujon, C., 2021. Mammalian and Avian Host Cell Influenza A Restriction Factors. *Viruses* 13, 522.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., O'Garra, A., 2015. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15, 87-103.
- Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A., 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309, 18-31.
- Meischel, T., Villalon-Letelier, F., Saunders, P.M., Reading, P.C., Londrigan, S.L., 2020. Influenza A virus interactions with macrophages: Lessons from epithelial cells. *Cell Microbiol* 22, e13170.

- Mendelson, M., Tekoah, Y., Zilka, A., Gershoni-Yahalom, O., Gazit, R., Achdout, H., Bovin, N.V., Meningher, T., Mandelboim, M., Mandelboim, O., David, A., Porgador, A., 2010. (Wesley et al., 2004). *J Virol* 84, 3789-3797.
- Meng, F., Punyadarsaniya, D., Uhlenbruck, S., Hennig-Pauka, I., Schwegmann-Wessels, C., Ren, X., Dürrwald, R., Herrler, G., 2013. Replication characteristics of swine influenza viruses in precision-cut lung slices reflect the virulence properties of the viruses. *Veterinary research* 44, 110.
- Merlot, E., 2004. Conséquences du stress sur la fonction immunitaire chez les animaux d'élevage., Institut national de la recherche agronomique, Paris, FRANCE, Vol 17. 10 p.
- Miguel, J.C., Chen, J., Van Alstine, W.G., Johnson, R.W., 2010. Expression of inflammatory cytokines and Toll-like receptors in the brain and respiratory tract of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary immunology and immunopathology* 135, 314-319.
- Montaner-Tarbes, S., del Portillo, H.A., Montoya, M., Fraile, L., 2019. Key gaps in the knowledge of the porcine respiratory reproductive syndrome virus (PRRSV). *Frontiers in Veterinary Science* 6.
- Morrow-Tesch, J.L., McGlone, J.J., Salak-Johnson, J.L., 1994. Heat and social stress effects on pig immune measures. *J Anim Sci* 72, 2599-2609.
- Mostafa, A., Abdelwhab, E.M., Mettenleiter, T.C., Pleschka, S., 2018. Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview. *Viruses* 10.
- Mozdzanowska, K., Maiese, K., Furchner, M., Gerhard, W., 1999. Treatment of influenza virus-infected SCID mice with nonneutralizing antibodies specific for the transmembrane proteins matrix 2 and neuraminidase reduces the pulmonary virus titer but fails to clear the infection. *Virology* 254, 138-146.
- Munier, S., Moisy, D., Marc, D., Naffakh, N., 2010. [Interspecies transmission, adaptation to humans and pathogenicity of animal influenza viruses]. *Pathologie-biologie* 58, e59-68.
- Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R., Kawaoka, Y., 2013. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol* 87, 2455-2462.
- Murphy, B.R., Nelson, D.L., Wright, P.F., Tierney, E.L., Phelan, M.A., Chanock, R.M., 1982. Secretory and systemic immunological response in children infected with live attenuated influenza A virus vaccines. *Infect Immun* 36, 1102-1108.
- Nakajima, E., Morozumi, T., Tsukamoto, K., Watanabe, T., Plastow, G., Mitsuhashi, T., 2007. A naturally occurring variant of porcine Mx1 associated with increased susceptibility to influenza virus in vitro. *Biochemical genetics* 45, 11-24.
- Nan, Y., Wu, C., Gu, G., Sun, W., Zhang, Y.J., Zhou, E.M., 2017. Improved Vaccine against PRRSV: Current Progress and Future Perspective. *Frontiers in microbiology* 8, 1635.
- Nathues, H., Alarcon, P., Rushton, J., Jolie, R., Fiebig, K., Jimenez, M., Geurts, V., Nathues, C., 2017. Cost of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at individual farm level - An economic disease model. *Prev Vet Med* 142, 16-29.
- Nayak, D.P., Balogun, R.A., Yamada, H., Zhou, Z.H., Barman, S., 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus research* 143, 147-161.
- Nayak, D.P., Hui, E.K., Barman, S., 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus research* 106, 147-165.
- Nedumpun, T., Sirisereewan, C., Thanmuan, C., Techapongtada, P., Puntarotairung, R., Naraprasertkul, S., Thanawongnuwech, R., Suradhat, S., 2018. Induction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-specific regulatory T lymphocytes (Treg) in the lungs and tracheobronchial lymph nodes of PRRSV-infected pigs. *Veterinary microbiology* 216, 13-19.
- Nelli, R.K., Kuchipudi, S.V., White, G.A., Perez, B.B., Dunham, S.P., Chang, K.C., 2010. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet Res* 6, 4.
- Nelson, M.I., Worobey, M., 2018. Origins of the 1918 Pandemic: Revisiting the Swine "Mixing Vessel" Hypothesis. *Am J Epidemiol* 187, 2498-2502.
- Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Green, A.L., Zimmerman, J.J., 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and

- respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 227, 385-392.
- Niederwerder, M.C., Jaing, C.J., Thissen, J.B., Cino-Ozuna, A.G., McLoughlin, K.S., Rowland, R.R.R., 2016. Microbiome associations in pigs with the best and worst clinical outcomes following co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary microbiology* 188, 1-11.
- 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, 225.
- Oh, T., Kim, H., Park, K.H., Jeong, J., Yang, S., Kang, I., Chae, C., 2019. Comparison of four commercial PRRSV MLV vaccines in herds with co-circulation of PRRSV-1 and PRRSV-2. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 63, 66-73.
- OIE, porcine reproductive and respiratory syndrome, general disease information sheets.
- Opriessnig, T., Fenaux, M., Thomas, P., Hoogland, M.J., Rothschild, M.F., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006a. Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Vet Pathol* 43, 281-293.
- Opriessnig, T., Gimenez-Lirola, L.G., Halbur, P.G., 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev* 12, 133-148.
- Opriessnig, T., Halbur, P.G., Yoon, K.J., Pogranichniy, R.M., Harmon, K.M., Evans, R., Key, K.F., Pallares, F.J., Thomas, P., Meng, X.J., 2002. Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *J Virol* 76, 11837-11844.
- Opriessnig, T., Mattei, A.A., Karuppanan, A.K., Halbur, P.G., 2021. Future perspectives on swine viral vaccines: where are we headed? *Porcine Health Manag* 7, 1.
- Opriessnig, T., McKeown, N.E., Harmon, K.L., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006b. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 13, 923-929.
- Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Rothschild, M., Kuhar, D., Lunney, J.K., Juhan, N.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2009. Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *J Anim Sci* 87, 1582-1590.
- Osorio, F.A., Galeota, J.A., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., Zuckermann, F., 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, 9-20.
- Ouyang, T., Zhang, X., Liu, X., Ren, L., 2019. Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses. *Viruses* 11.
- 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. *The Journal of general virology* 88, 925-931.
- Park, S.J., Seo, H.W., Park, C., Chae, C., 2014. Interaction between single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines on dually infected pigs. *Research in veterinary science* 96, 516-522.
- Patel, D., Nan, Y., Shen, M., Ritthipichai, K., Zhu, X., Zhang, Y.J., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation. *J Virol* 84, 11045-11055.
- Peng, J.Y., Shin, D.L., Li, G., Wu, N.H., Herrler, G., 2021. Time-dependent viral interference between influenza virus and coronavirus in the infection of differentiated porcine airway epithelial cells. *Virulence* 12, 1111-1121.
- Peng, Y.T., Chung, H.C., Chang, H.L., Chang, H.C., Chung, W.B., 2009. Modulations of phenotype and cytokine expression of porcine bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary microbiology* 136, 359-365.

- Pensaert, M., Ottis, K., Vandeputte, J., Kaplan, M.M., Bachmann, P.A., 1981. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducts to swine and its potential importance for man. *Bulletin of the World Health Organization* 59, 75-78.
- Pileri, E., Gibert, E., Soldevila, F., García-Saenz, A., Pujols, J., Diaz, I., Darwich, L., Casal, J., Martín, M., Mateu, E., 2015. Vaccination with a genotype 1 modified live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus significantly reduces viremia, viral shedding and transmission of the virus in a quasi-natural experimental model. *Veterinary microbiology* 175, 7-16.
- Pileri, E., Mateu, E., 2016a. Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Veterinary research* 47, 1-13.
- Pileri, E., Mateu, E., 2016b. Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Veterinary research* 47, 108.
- Piñeyro, P.E., Subramaniam, S., Kenney, S.P., Heffron, C.L., Giménez-Lirola, L.G., Meng, X.J., 2016. Modulation of Proinflammatory Cytokines in Monocyte-Derived Dendritic Cells by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Through Interaction with the Porcine Intercellular-Adhesion-Molecule-3-Grabbing Nonintegrin. *Viral Immunol* 29, 546-556.
- Pippig, J., Ritzmann, M., Büttner, M., Neubauer-Juric, A., 2016. Influenza A Viruses Detected in Swine in Southern Germany after the H1N1 Pandemic in 2009. *Zoonoses Public Health* 63, 555-568.
- Piras, F., Bollard, S., Laval, F., Joisel, F., Reynaud, G., Charreyre, C., Andreoni, C., Juillard, V., 2005. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-specific interferon-gamma(+) T-cell responses after PRRS virus infection or vaccination with an inactivated PRRS vaccine. *Viral Immunol* 18, 381-389.
- Pirzadeh, B., Dea, S., 1997. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *The Journal of general virology* 78 (Pt 8), 1867-1873.
- Pizzolla, A., Wakim, L.M., 2019. Memory T Cell Dynamics in the Lung during Influenza Virus Infection. *J Immunol* 202, 374-381.
- Plagemann, P.G., Moennig, V., 1992. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Advances in virus research* 41, 99-192.
- Plana Duran, J., Climent, I., Sarraseca, J., Urniza, A., Cortés, E., Vela, C., Casal, J.I., 1997. Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus genes* 14, 19-29.
- Pol, J.M., van Leengoed, L.A., Stockhofe, N., Kok, G., Wensvoort, G., 1997. Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/Actinobacillus pleuropneumoniae in the respiratory tract. *Veterinary microbiology* 55, 259-264.
- Pomorska-Mól, M., Dors, A., Kwit, K., Czyżewska-Dors, E., Pejsak, Z., 2017. Coinfection modulates inflammatory responses, clinical outcome and pathogen load of H1N1 swine influenza virus and Haemophilus parasuis infections in pigs. *BMC Vet Res* 13, 376.
- Pomorska-Mól, M., Kwit, K., Markowska-Daniel, I., Kowalski, C., Pejsak, Z., 2014a. Local and systemic immune response in pigs during subclinical and clinical swine influenza infection. *Research in veterinary science* 97, 412-421.
- Pomorska-Mól, M., Kwit, K., Pejsak, Z., Markowska-Daniel, I., 2014b. Analysis of the acute-phase protein response in pigs to clinical and subclinical infection with H3N2 swine influenza virus. *Influenza and other respiratory viruses* 8, 228-234.
- Pomorska-Mól, M., Markowska-Daniel, I., Kwit, K., 2012. Immune and acute phase response in pigs experimentally infected with H1N2 swine influenza virus. *FEMS Immunol Med Microbiol* 66, 334-342.
- Pomorska-Mól, M., Markowska-Daniel, I., Kwit, K., Czyżewska, E., Dors, A., Rachubik, J., Pejsak, Z., 2014c. Immune and inflammatory response in pigs during acute influenza caused by H1N1 swine influenza virus. *Arch Virol* 159, 2605-2614.
- Pomorska-Mól, M., Markowska-Daniel, I., Kwit, K., Stepniewska, K., Pejsak, Z., 2013. C-reactive protein, haptoglobin, serum amyloid A and pig major acute phase protein response in pigs

- simultaneously infected with H1N1 swine influenza virus and *Pasteurella multocida*. *BMC Veterinary Research* 9.
- Pomorska-Mol, M., Podgorska, K., Czyzewska-Dors, E., Turlewicz-Podbielska, H., Gogulski, M., Wlodarek, J., Lukomska, A., 2020. Kinetics of single and dual simultaneous infection of pigs with swine influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Intern Med*.
- Prather, R.S., Rowland, R.R., Ewen, C., Tribble, B., Kerrigan, M., Bawa, B., Teson, J.M., Mao, J., Lee, K., Samuel, M.S., Whitworth, K.M., Murphy, C.N., Egen, T., Green, J.A., 2013. An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* 87, 9538-9546.
- Prieto, C., Castro, J.M., 2005. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology* 63, 1-16.
- Provost, C., Hamonic, G., Gagnon, C.A., Meurens, F., 2017. Dual infections of CD163 expressing NPTr epithelial cells with influenza A virus and PRRSV. *Veterinary microbiology* 207, 143-148.
- Qi, W., Zhu, R., Bao, C., Xiao, J., Liu, B., Sun, M., Feng, X., Gu, J., Li, Y., Lei, L., 2019. Porcine circovirus type 2 promotes *Actinobacillus pleuropneumoniae* survival during coinfection of porcine alveolar macrophages by inhibiting ROS production. *Veterinary microbiology* 233, 93-101.
- Rahe, M.C., Murtaugh, M.P., 2017. Mechanisms of adaptive immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viruses* 9.
- Rajão, D.S., Pérez, D.R., 2018. Universal Vaccines and Vaccine Platforms to Protect against Influenza Viruses in Humans and Agriculture. *Frontiers in microbiology* 9, 123.
- Ramirez, A., Capuano, A.W., Wellman, D.A., Leshner, K.A., Setterquist, S.F., Gray, G.C., 2006. Preventing zoonotic influenza virus infection. *Emerg Infect Dis* 12, 996-1000.
- Rathkjen, P.H., Dall, J., 2017. Control and eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 using a modified-live type 2 vaccine in combination with a load, close, homogenise model: an area elimination study. *Acta Vet Scand* 59, 4.
- Reeves, R.K., Forberg, H., Hauge, A.G., Valheim, M., Garcon, F., Nunez, A., Gerner, W., Mair, K.H., Graham, S.P., Brookes, S.M., Storset, A.K., 2014. Early Responses of Natural Killer Cells in Pigs Experimentally Infected with 2009 Pandemic H1N1 Influenza A Virus. *PloS one* 9.
- Renson, P., Fablet, C., Andraud, M., Normand, V., Leuret, A., Paboeuf, F., Rose, N., Bourry, O., 2019. Maternally-derived neutralizing antibodies reduce vaccine efficacy against porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vaccine* 37, 4318-4324.
- Renson, P., Rose, N., Le Dimna, M., Mahe, S., Keranflec'h, A., Paboeuf, F., Belloc, C., Le Potier, M.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, 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, 457-466.
- Renukaradhya, G.J., Meng, X.J., Calvert, J.G., Roof, M., Lager, K.M., 2015. Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: Current status and future direction. *Vaccine* 33, 3065-3072.
- 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.
- Rose, N., Hervé, S., Eveno, E., Barbier, N., Eono, F., Dorenlor, V., Andraud, M., Camsusou, C., Madec, F., Simon, G., 2013. Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pig farms: evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and reassortment events. *Veterinary research* 44, 72.
- Rose N, H.S., Eveno E, Barbier N, Eono F, Dorenlor V, Camsusou C, Madec F, Simon G, 2013. Caractéristiques épidémiologiques des infections grippales récurrentes en élevage porcin. *Journées Recherche Porcine* 261-266.

- Rose, N., Renson, P., Andraud, M., Paboeuf, F., Le Potier, M.F., Bourry, O., 2015. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) modified-live vaccine reduces virus transmission in experimental conditions. *Vaccine* 33, 2493-2499.
- Rotolo, M.L., Giménez-Lirola, L., Ji, J., Magtoto, R., Henao-Díaz, Y.A., Wang, C., Baum, D.H., Harmon, K.M., Main, R.G., Zimmerman, J.J., 2018. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-specific IgM-IgA in oral fluid samples reveals PRRSV infection in the presence of maternal antibody. *Veterinary microbiology* 214, 13-20.
- Saade, G., Deblanc, C., Bougon, J., Marois-Crehan, C., Fablet, C., Auray, G., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M., Gagnon, C.A., Zhu, J., Gottschalk, M., Summerfield, A., Simon, G., Bertho, N., Meurens, F., 2020a. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Veterinary research* 51, 80.
- Saade, G., Menard, D., Hervet, C., Renson, P., Hue, E., Zhu, J., Dubreil, L., Paillot, R., Pronost, S., Bourry, O., Simon, G., Dupont, J., Bertho, N., Meurens, F., 2020b. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Interferes with Swine Influenza A Virus Infection of Epithelial Cells. *Vaccines* 8.
- Salvesen, H.A., Whitelaw, C.B.A., 2021. Current and prospective control strategies of influenza A virus in swine. *Porcine Health Manag* 7, 23.
- Sansom, J.N., de Bruin, T.G., Voermans, J.J., Meulenber, J.J., Pol, J.M., Bianchi, A.T., 2000. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8(+) cells. *The Journal of general virology* 81, 497-505.
- Sánchez-Carvajal, J.M., Rodríguez-Gómez, I.M., Ruedas-Torres, I., Larenas-Muñoz, F., Díaz, I., Revilla, C., Mateu, E., Domínguez, J., Martín-Valls, G., Barranco, I., Pallarés, F.J., Carrasco, L., Gómez-Laguna, J., 2020. Activation of pro- and anti-inflammatory responses in lung tissue injury during the acute phase of PRRSV-1 infection with the virulent strain Lena. *Veterinary microbiology* 246, 108744.
- Sanders, C.J., Doherty, P.C., Thomas, P.G., 2011. Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. *Cell and tissue research* 343, 13-21.
- Selman, M., Dankar, S.K., Forbes, N.E., Jia, J.J., Brown, E.G., 2012. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerg Microbes Infect* 1, e42.
- Senthilkumar, D., Rajukumar, K., Sen, A., Kumar, M., Shrivastava, D., Kalaiyarasu, S., Gautam, S., Singh, F., Kulkarni, D.D., Singh, V.P., 2018. Pathogenic characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of Indian origin in experimentally infected piglets. *Transbound Emerg Dis* 65, 1522-1536.
- Shanmukhappa, K., Kim, J.K., Kapil, S., 2007. Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology* 4, 62.
- Shi, M., Lam, T.T., Hon, C.C., Hui, R.K., Faaberg, K.S., Wennblom, T., Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Leung, F.C., 2010. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus research* 154, 7-17.
- Shi, X., Wang, L., Li, X., Zhang, G., Guo, J., Zhao, D., Chai, S., Deng, R., 2011. Endoribonuclease activities of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp11 was essential for nsp11 to inhibit IFN- β induction. *Mol Immunol* 48, 1568-1572.
- Shope, R.E., 1931. THE ETIOLOGY OF SWINE INFLUENZA. *Science* 73, 214-215.
- Siddell, S.G., Walker, P.J., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Adams, M.J., Dutilh, B.E., Gorbalenya, A.E., Harrach, B., Harrison, R.L., Junglen, S., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Nibert, M., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M., Davison, A.J., 2019. Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018). *Arch Virol* 164, 943-946.
- 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, 264-271.
- Simon, G., 2010. Le porc, hôte intermédiaire pour la génération de virus influenza réassortants à potentiel zoonotique. *Virologie* 14 (1), 24-25.

- Simon, G., Hervé, S., Rose, N., 2013. [Epidemiology surveillance of swine influenza in France from 2005 to 2012: programs, viruses and associated epidemiological data] *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation Anses-DGAI* 56, 17-22.
- Simon, G., Larsen, L.E., Dürrwald, R., Foni, E., Harder, T., Van Reeth, K., Markowska-Daniel, I., Reid, S.M., Dan, A., Maldonado, J., Huovilainen, A., Billinis, C., Davidson, I., Agüero, M., Vila, T., Hervé, S., Breum, S., Chiapponi, C., Urbaniak, K., Kyriakis, C.S., Brown, I.H., Loeffen, W., 2014. European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and Swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. *PloS one* 9, e115815.
- Sisteré-Oró, M., López-Serrano, S., Veljkovic, V., Pina-Pedrero, S., Vergara-Alert, J., Córdoba, L., Pérez-Maillo, M., Pleguezuelos, P., Vidal, E., Segalés, J., Nielsen, J., Fomsgaard, A., Darji, A., 2019. DNA vaccine based on conserved HA-peptides induces strong immune response and rapidly clears influenza virus infection from vaccinated pigs. *PloS one* 14, e0222201.
- Skovgaard, K., Cirera, S., Vasby, D., Podolska, A., Breum, S., Dürrwald, R., Schlegel, M., Heegaard, P.M., 2013. Expression of innate immune genes, proteins and microRNAs in lung tissue of pigs infected experimentally with influenza virus (H1N2). *Innate Immun* 19, 531-544.
- Snijder, E.J., Kikkert, M., Fang, Y., 2013. Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *The Journal of general virology* 94, 2141-2163.
- Sridhar, S., Begom, S., Bermingham, A., Hoschler, K., Adamson, W., Carman, W., Bean, T., Barclay, W., Deeks, J.J., Lalvani, A., 2013. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat Med* 19, 1305-1312.
- Stadejek T, Porowski M, Pejsak, 2005. Viraemia and seroconversion in piglets following vaccination with PRRSV-EU type vaccine—a field observation. *Bull Vet Inst Pulawy* 49, 273–277.
- Starbæk, S.M.R., Brogaard, L., Dawson, H.D., Smith, A.D., Heegaard, P.M.H., Larsen, L.E., Jungersen, G., Skovgaard, K., 2018. Animal Models for Influenza A Virus Infection Incorporating the Involvement of Innate Host Defenses: Enhanced Translational Value of the Porcine Model. *ILAR journal* 59, 323-337.
- Stärk, K.D., 2000. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine—a literature review. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 159, 37-56.
- Steinhauer, D.A., 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258, 1-20.
- Sun, N., Sun, P., Lv, H., Sun, Y., Guo, J., Wang, Z., Luo, T., Wang, S., Li, H., 2016. Matriline displayed antiviral activity in porcine alveolar macrophages co-infected by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Scientific Reports* 6.
- Sun, Y., Han, M., Kim, C., Calvert, J.G., Yoo, D., 2012. Interplay between interferon-mediated innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viruses* 4, 424-446.
- Talker, S.C., Stadler, M., Koinig, H.C., Mair, K.H., Rodriguez-Gomez, I.M., Graage, R., Zell, R., Dürrwald, R., Starick, E., Harder, T., Weissenböck, H., Lamp, B., Hammer, S.E., Ladinig, A., Saalmüller, A., Gerner, W., 2016. Influenza A Virus Infection in Pigs Attracts Multifunctional and Cross-Reactive T Cells to the Lung. *J Virol* 90, 9364-9382.
- Tang, D., Liu, J., Li, C., Zhang, H., Ma, P., Luo, X., Zeng, Z., Hong, N., Liu, X., Wang, B., Wang, F., Gan, Z., Hao, F., 2014. Positive effects of porcine IL-2 and IL-4 on virus-specific immune responses induced by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ORF5 DNA vaccine in swine. *J Vet Sci* 15, 99-109.
- Tashiro, M., Ciborowski, P., Klenk, H.D., Pulverer, G., Rott, R., 1987. Role of Staphylococcus protease in the development of influenza pneumonia. *Nature* 325, 536-537.
- Tellier, R., 2009. Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies. *Journal of the Royal Society, Interface* 6 Suppl 6, S783-790.
- Thacker, E., Thanawongnuwech, R., 2002. Porcine respiratory disease complex (PRDC). *Thai J. Vet. Med.* 32, 126-134.
- Thacker, E.L., 2001. Immunology of the Porcine Respiratory Disease Complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 17, 551-565.

- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A., Damrongwatanapokin, S., 2004a. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Veterinary microbiology* 101, 9-21.
- Thanawongnuwech, R., Brown, G.B., Halbur, P.G., Roth, J.A., Royer, R.L., Thacker, B.J., 2000. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. *Veterinary Pathology* 37, 143-152.
- Thanawongnuwech, R., Thacker, B., Halbur, P., Thacker, E.L., 2004b. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 901-908.
- Thanawongnuwech, R., Young, T.F., Thacker, B.J., Thacker, E.L., 2001. Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Veterinary immunology and immunopathology* 79, 115-127.
- Tingstedt, J.E., Nielsen, J., 2004. Cellular immune responses in the lungs of pigs infected in utero with PRRSV: an immunohistochemical study. *Viral Immunol* 17, 558-564.
- Tomasello, E., Pollet, E., Vu Manh, T.P., Uze, G., Dalod, M., 2014. Harnessing Mechanistic Knowledge on Beneficial Versus Deleterious IFN-I Effects to Design Innovative Immunotherapies Targeting Cytokine Activity to Specific Cell Types. *Front Immunol* 5, 526.
- Tong, G.Z., Zhou, Y.J., Hao, X.F., Tian, Z.J., An, T.Q., Qiu, H.J., 2007. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China. *Emerg Infect Dis* 13, 1434-1436.
- Torremorell, M., Allerson, M., Corzo, C., Diaz, A., Gramer, M., 2012. Transmission of influenza A virus in pigs. *Transbound Emerg Dis* 59 Suppl 1, 68-84.
- Trebbien, R., Larsen, L.E., Viuff, B.M., 2011. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virol J* 8, 434.
- Van de Sandt, C.E., Kreijtz, J.H.C.M., Rimmelzwaan, G.F., 2012. Evasion of Influenza A Viruses from Innate and Adaptive Immune Responses. *Viruses* 4, 1438-1476.
- van der Linden, I.F., Voermans, J.J., van der Linde-Bril, E.M., Bianchi, A.T., Steverink, P.J., 2003. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. *Vaccine* 21, 1952-1957.
- van Eijk, M., White, M.R., Batenburg, J.J., Vaandrager, A.B., van Golde, L.M., Haagsman, H.P., Hartshorn, K.L., 2004. Interactions of influenza A virus with sialic acids present on porcine surfactant protein D. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 871-879.
- Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Journal of general virology* 89, 2943-2953.
- van Gucht, S., van Reeth, K., Pensaert, M., 2003. Interaction between porcine reproductive-respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: potentiation of cytokine production and respiratory disease. *J Clin Microbiol* 41, 960-966.
- Van Poucke, S.G., Nicholls, J.M., Nauwynck, H.J., Van Reeth, K., 2010. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. *Virol J* 7, 38.
- Van Reeth, K., 2007. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Veterinary research* 38, 243-260.
- Van Reeth K, Vincent AL, KM., L., 2016. Vaccines and vaccination for swine influenza: differing situations in Europe and the US.
- Van Reeth, K., Brown, I.H., Olsen, C.W., 2012. Influenza Virus, in: Zimmerman J.J., K.L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. (Ed.), *Diseases of Swine*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 557-571.
- Van Reeth, K., Brown, I.H., Pensaert, M., 2000. Isolations of H1N2 influenza A virus from pigs in Belgium. *The Veterinary record* 146, 588-589.
- Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., 1996. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Veterinary microbiology* 48, 325-335.
- Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., 2001. Clinical effects of experimental dual infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by swine influenza virus in

- conventional and colostrum-deprived pigs. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 48, 283-292.
- Van Reeth, K., Pensaert, M.B., 1994. Porcine respiratory coronavirus-mediated interference against influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. *American journal of veterinary research* 55, 1275-1281.
- Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M.R., Regamey, N., 2011. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev* 24, 210-229.
- Vasin, A.V., Temkina, O.A., Egorov, V.V., Klotchenko, S.A., Plotnikova, M.A., Kiselev, O.I., 2014. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus research* 185, 53-63.
- Veas, F., 2011. Acute phase proteins as early non-specific biomarkers of human and veterinary diseases.
- Villalón-Letelier, F., Brooks, A.G., Saunders, P.M., Londrigan, S.L., Reading, P.C., 2017. Host Cell Restriction Factors that Limit Influenza A Infection. *Viruses* 9.
- Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Richt, J.A., Janke, B.H., Sandbulte, M.R., Gauger, P.C., Loving, C.L., Webby, R.J., García-Sastre, A., 2012. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease. *J Virol* 86, 10597-10605.
- Vincent, A.L., Thacker, B.J., Halbur, P.G., Rothschild, M.F., Thacker, E.L., 2006. An investigation of susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus between two genetically diverse commercial lines of pigs. *J Anim Sci* 84, 49-57.
- Wang, R., Zhang, Y.J., 2014. Antagonizing interferon-mediated immune response by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *BioMed Research International* 2014.
- Watson, S.J., Langat, P., Reid, S.M., Lam, T.T., Cotten, M., Kelly, M., Van Reeth, K., Qiu, Y., Simon, G., Bonin, E., Foni, E., Chiapponi, C., Larsen, L., Hjulsager, C., Markowska-Daniel, I., Urbaniak, K., Dürrwald, R., Schlegel, M., Huovilainen, A., Davidson, I., Dán, Á., Loeffen, W., Edwards, S., Bublot, M., Vila, T., Maldonado, J., Valls, L., Brown, I.H., Pybus, O.G., Kellam, P., 2015. Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J Virol* 89, 9920-9931.
- Wei, H., Lenz, S.D., Alstine, W.G.V., Stevenson, G.W., Langohr, I.M., Pogranichniy, R.M., 2010. Infection of Cesarean-Derived Colostrum-Deprived Pigs with Porcine Circovirus Type 2 and Swine Influenza Virus. *Comparative Medicine* 60, 6.
- Wenhui, L., Zhongyan, W., Guanqun, Z., Zhili, L., JingYun, M., Qingmei, X., Baoli, S., Yingzuo, B., 2012. Complete genome sequence of a novel variant porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strain: evidence for recombination between vaccine and wild-type PRRSV strains. *J Virol* 86, 9543.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J., 1991a. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *The veterinary quarterly* 13, 121-130.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J., Wagenaar, F., 1991b. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). . In: *Proc Porcine Reprod Respir Syndrom Seminar*.
- Wesley, R.D., Tang, M., Lager, K.M., 2004. Protection of weaned pigs by vaccination with human adenovirus 5 recombinant viruses expressing the hemagglutinin and the nucleoprotein of H3N2 swine influenza virus. *Vaccine* 22, 3427-3434.
- White, M., 2011. Porcine respiratory disease complex (PRDC): Part 2: Non-infectious factors. *Livestock* 16, 44-46
- WHO, 1980. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization* 58, 585-591.
- 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. *J Clin Microbiol* 41, 58-62.
- Wise, H.M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R.M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E.C., Barclay, W.S., Digard, P., 2009. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* 83, 8021-8031.

- Wise, H.M., Hutchinson, E.C., Jagger, B.W., Stuart, A.D., Kang, Z.H., Robb, N., Schwartzman, L.M., Kash, J.C., Fodor, E., Firth, A.E., Gog, J.R., Taubenberger, J.K., Digard, P., 2012. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog* 8, e1002998.
- Woodland, D.L., Randall, T.D., 2004. Anatomical features of anti-viral immunity in the respiratory tract. *Seminars in immunology* 16, 163-170.
- Wu, J., Peng, X., Zhou, A., Qiao, M., Wu, H., Xiao, H., Liu, G., Zheng, X., Zhang, S., Mei, S., 2014. MiR-506 inhibits PRRSV replication in MARC-145 cells via CD151. *Molecular and cellular biochemistry* 394, 275-281.
- Wu, W., Metcalf, J.P., 2020. The Role of Type I IFNs in Influenza: Antiviral Superheroes or Immunopathogenic Villains? *J Innate Immun*, 1-11.
- Yan, Q., Yang, H., Yang, D., Zhao, B., Ouyang, Z., Liu, Z., Fan, N., Ouyang, H., Gu, W., Lai, L., 2014. Production of transgenic pigs over-expressing the antiviral gene Mx1. *Cell regeneration (London, England)* 3, 11.
- Yang, H., Zhang, J., Zhang, X., Shi, J., Pan, Y., Zhou, R., Li, G., Li, Z., Cai, G., Wu, Z., 2018. CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Antiviral research* 151, 63-70.
- Yang, L., Zhang, Y.J., 2017. Antagonizing cytokine-mediated JAK-STAT signaling by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary microbiology* 209, 57-65.
- Yazawa, S., Okada, M., Ono, M., Fujii, S., Okuda, Y., Shibata, I., Kida, H., 2004. Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus (A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary microbiology* 98, 221-228.
- Yu, J., Liu, Y., Zhang, Y., Zhu, X., Ren, S., Guo, L., Liu, X., Sun, W., Chen, Z., Cong, X., Chen, L., Shi, J., Du, Y., Li, J., Wu, J., Wang, J., 2017. The integrity of PRRSV nucleocapsid protein is necessary for up-regulation of optimal interleukin-10 through NF- κ B and p38 MAPK pathways in porcine alveolar macrophages. *Microb Pathog* 109, 319-324.
- Zamarin, D., García-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R., Palese, P., 2005. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* 1, e4.
- Zhang, J., Miao, J., Hou, J., Lu, C., 2015. The effects of H3N2 swine influenza virus infection on TLRs and RLRs signaling pathways in porcine alveolar macrophages. *Virology* 12, 61.
- 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.
- Zhang, Q., Yoo, D., 2015. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Veterinary microbiology* 177, 229-241.
- Zheng, W., Tao, Y.J., 2013. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Lett* 587, 1206-1214.
- Zhou, L., Ge, X., Yang, H., 2021. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Modified Live Virus Vaccine: A “Leaky” Vaccine with Debatable Efficacy and Safety. *Vaccines* 9, 362.
- Zhou, L., Ni, Y.Y., Piñeyro, P., Cossaboom, C.M., Subramaniam, S., Sanford, B.J., Dryman, B.A., Huang, Y.W., Meng, X.J., 2013. Broadening the heterologous cross-neutralizing antibody inducing ability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by breeding the GP4 or M genes. *PloS one* 8, e66645.
- Zhou, P., Fan, H., Lan, T., Yang, X.L., Shi, W.F., Zhang, W., Zhu, Y., Zhang, Y.W., Xie, Q.M., Mani, S., Zheng, X.S., Li, B., Li, J.M., Guo, H., Pei, G.Q., An, X.P., Chen, J.W., Zhou, L., Mai, K.J., Wu, Z.X., Li, D., Anderson, D.E., Zhang, L.B., Li, S.Y., Mi, Z.Q., He, T.T., Cong, F., Guo, P.J., Huang, R., Luo, Y., Liu, X.L., Chen, J., Huang, Y., Sun, Q., Zhang, X.L., Wang, Y.Y., Xing, S.Z., Chen, Y.S., Sun, Y., Li, J., Daszak, P., Wang, L.F., Shi, Z.L., Tong, Y.G., Ma, J.Y., 2018. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature* 556, 255-258.
- Zhou, L., Ni, Y.Y., Piñeyro, P., Sanford, B.J., Cossaboom, C.M., Dryman, B.A., Huang, Y.W., Cao, D.J., Meng, X.J., 2012. DNA shuffling of the GP3 genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) produces a chimeric virus with an improved cross-neutralizing ability against a heterologous PRRSV strain. *Virology* 434, 96-109.



ANNEXES

ANNEXE 1: Publication n°4 «Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract »


Dans le cadre d'une collaboration avec l'UMR BIOEPAR, ONIRIS, Nantes, la doctorante a participé à la rédaction d'une revue sur les co-infections bactériennes et/ou virales ainsi que leurs conséquences dans le tractus respiratoire porcin. Cette revue a été publiée en 2021 dans la revue *Veterinary Research*.

REVIEW

Open Access



Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract

Georges Saade¹, Céline Deblanc², Juliette Bougon^{2,3}, Corinne Marois-Créhan⁴, Christelle Fablet⁵, Gaël Auray⁶, Catherine Belloc¹, Mily Leblanc-Maridor¹, Carl A. Gagnon⁷, Jianzhong Zhu^{8,9}, Marcelo Gottschalk⁷, Artur Summerfield^{6,10}, Gaëlle Simon², Nicolas Bertho¹ and François Meurens^{1*} 

Abstract

Understudied, coinfections are more frequent in pig farms than single infections. In pigs, the term “Porcine Respiratory Disease Complex” (PRDC) is often used to describe coinfections involving viruses such as swine Influenza A Virus (swIAV), Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), and Porcine CircoVirus type 2 (PCV2) as well as bacteria like *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Bordetella bronchiseptica*. The clinical outcome of the various coinfection or superinfection situations is usually assessed in the studies while in most of cases there is no clear elucidation of the fine mechanisms shaping the complex interactions occurring between microorganisms. In this comprehensive review, we aimed at identifying the studies dealing with coinfections or superinfections in the pig respiratory tract and at presenting the interactions between pathogens and, when possible, the mechanisms controlling them. Coinfections and superinfections involving viruses and bacteria were considered while research articles including protozoan and fungi were excluded. We discuss the main limitations complicating the interpretation of coinfection/superinfection studies, and the high potential perspectives in this fascinating research field, which is expecting to gain more and more interest in the next years for the obvious benefit of animal health.

Table of Contents

- 1 Introduction
- 2 Porcine respiratory disease complex and the associated pathogens
 - 2.1 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
 - 2.2 Porcine circovirus type 2
 - 2.3 Swine influenza A virus
 - 2.4 Porcine respiratory alphacoronavirus
 - 2.5 Aujeszky’s disease virus or PseudoRabies Virus (PRV)
 - 2.6 *Actinobacillus pleuropneumoniae*
 - 2.7 *Mycoplasma hyopneumoniae*
 - 2.8 *Bordetella bronchiseptica*
- 3 Coinfections and superinfections and the resultant consequences for the porcine host
 - 3.1 Selection and exclusion criteria for considered studies
 - 3.2 The different types of coinfections
 - 3.2.1 Virus–virus
 - 3.2.2 Bacterium–virus and virus–bacterium
 - 3.2.3 Bacterium–bacterium
 - 3.3 Mechanisms of coinfections interferences
 - 3.3.1 Virus–virus interactions
 - 3.3.2 Bacterium–virus and virus–bacterium interactions

*Correspondence: francois.meurens@inrae.fr

¹ INRAE, Oniris, BIOEPAR, 44300 Nantes, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. 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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence 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 licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

3.3.3 Bacterium–bacterium interactions

3.4 Limitations of coinfection studies

4 Conclusion and perspectives

References

1 Introduction

Bacterial and viral respiratory diseases are a major health issue in species reared under confined conditions in large groups. Most often multiple infectious agents are involved in the development of these clinical conditions making unsuited the common reductionist approach of host–pathogen interactions by the study of single infection [1]. Infection by more than one type of pathogen (viruses, bacteria and parasites amongst others) is described as a mixed infection. However, the term coinfection is frequently used to describe concomitant infection of a cell or a host by separate pathogens [2]. Since in the literature the definitions of coinfection and mixed infection have been both used to describe the same events, we will use the term “coinfection” in the current review. Additionally, in virology, the term superinfection is used if one virus infects the cell or the host before infection by the second superinfecting virus. We will also use the term “superinfection” in the review. Finally, an opportunistic pathogen is usually considered as a pathogen that would not have infected animals in absence of the primary infection, or alternatively, “pathogen” that would have been asymptomatic in the absence of the primary infection. In some studies, however, the use of the terms “coinfection” is not suitable and “superinfection” should be used instead, as we will see later. This semantic point is responsible for a lot of confusion and makes comparisons between studies sometimes tricky.

The outcome of any coinfection or superinfection can be affected by the interactions taking place between the infectious agents, the nature of the cell/host, adverse environmental and management conditions, intestinal and respiratory microbiomes, and the triggered immune response—innate and adaptive—developed afterwards [2, 3]. When occurring at the same time or with a delay, infections can impact the virulence of causative pathogens with subsequent consequences on the host immune response and its ability to clear the infections [2]. The first contact with a pathogen can change the cell/host response against any other second pathogen, possibly causing a more virulent infection, reducing its severity or suppressing it completely [4]. Thus, different scenarios concerning the pathogen interactions can be observed, the first infectious agent can promote the second one, attenuate its effects or simply prevent its establishment. Conversely, the second pathogen may also influence the first one directly or indirectly.

Coinfections have been described in both humans and animals [1, 2]. Moreover, bacterial and viral infections might be followed by secondary bacterial or viral infections, which in some cases are responsible for the pathology development and the observed clinical signs. In this review, the current knowledge regarding frequent coinfections that occur in the porcine respiratory tract and particularly in the lungs are reviewed. When possible, we focused on the interactions between the mentioned pathogens and the various mechanisms justifying these interactions and their consequences on the host’s response. We especially discussed coinfections involving main bacteria and viruses associated with the so-called porcine respiratory diseases, excluding coinfections involving parasites and fungi (including their metabolites, such as mycotoxins). Moreover, we do not discuss the impact of adverse environmental and management conditions which have been shown to be of major importance in the modulation of respiratory infections’ severity [3].

2 Porcine respiratory disease complex and the associated pathogens

Respiratory diseases have been formally described in pigs as early as the 1960’s [5] and several studies have been carried out to identify associated agents. The role of the infectious pathogens has been assessed by using two main approaches: direct research of the pathogens (by culture or Polymerase Chain Reaction—PCR for instance) from tissue samples of diseased (acute or chronic stage) and non-diseased pigs or indirect detection by serological tests to look for antibodies produced after exposure to specific pathogens. These studies indicated that frequently under field conditions, several infectious pathogens are simultaneously detected from lung lesions (see [6–8] amongst others). Combinations of several infectious pathogens in particular bacteria and viruses frequently occur and are responsible for respiratory diseases in pigs reared under confined conditions in large communities [1]. However, the type of combinations and associated infectious agents change over time with the emergence of new viral pathogens generally complicating disease severity [e.g. new strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), new types of Porcine Circovirus (PCV), new strains of Porcine Respiratory alphaCoronaVirus (PRCoV) and new reassortants of swine Influenza A Virus (swIAV)].

Causative respiratory infectious agents can be divided into primary and secondary or opportunistic pathogens. Primary pathogen being defined here as pathogen that can infect the animal as first unique pathogen and then facilitate secondary or opportunistic coinfection. These primary pathogens include common bacteria such as highly virulent *Actinobacillus* (*A.*) *pleuropneumoniae*,

M. hyopneumoniae, *Bordetella* (*B.*) *bronchiseptica* in young piglets and common viruses such as swIAV [1]. PRRSV and PCV2 are not strictly respiratory pathogens as swIAV, however, since they also frequently affect the respiratory system and since they can act as facilitators of secondary respiratory infections, they must be considered too. Other primary pathogens such as Aujeszky's Disease Virus (ADV) and PRCoV are reported but they are far less frequently encountered today or they have less impact on porcine health [1]. Then, some viruses like the porcine cytomegalovirus can also inhibit host immune functions—particularly the action of T lymphocytes—and promote respiratory diseases such as the porcine reproductive and respiratory syndrome [9]. Among the secondary pathogens common bacteria such as lower virulence strains of *A. pleuropneumoniae*, *A. suis*, *Glaesserella parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus* (*S.*) *suis* are reported. Together primary and secondary pathogens are involved in the “Porcine Respiratory Disease Complex” (PRDC) [10].

Several studies have assessed the nature of the infectious agents directly or indirectly associated with respiratory diseases in pigs [7, 8, 11, 12]. In one of these studies involving breeding sows in five French farrow-to-finish herds [12], results indicated that *S. suis*, a secondary pathogen, was quite widespread among sows—67.1% of the animals being positive using a PCR assay—and PCV2 and swIAV infections were highly prevalent (75% of the sows with antibodies against PCV2 and between 91.7% and 100% of the sows with antibodies against swIAV). Other infectious agents such as *A. pleuropneumoniae*, *G. parasuis* and *P. multocida* were detected in 31%, 25%, and 23% of the sows, respectively [12]. In another study evaluating infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds in France, it has been shown that *M. hyopneumoniae*, PRRSV, and swIAV subtype H1N1 were the major pathogens involved in pneumonia-like gross lesions [8]. For extensive pleuritis, PRRSV was frequently associated with *A. pleuropneumoniae* [8, 12]. Regarding bacteria associated with lung lesions in 3731 French slaughter pigs [8], a report mentioned lesions of pneumonia and pleuritis as the most frequent lesions. In these lesions, bacteria such as *M. hyopneumoniae*, *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae*, *S. suis*, and *G. parasuis* were detected in 69.3%, 36.9%, 20.7%, 6.4%, and 0.99% of the lungs, respectively [13]. In a retrospective analysis of the etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs in USA, two or more infectious agents were identified in 88.2% of the analyzed cases [7]. PRRSV (35.4% of the samples), *P. multocida* (31.6%), *M. hyopneumoniae* (27%), swIAV (22.2%), *G. parasuis* (22.0%) and PCV2 (18.6%) were the infectious agents most frequently encountered [7]. In Korean pigs,

PRRSV and PCV2 were frequently identified associated or not to various bacteria such as *S. suis* (25.2%), *M. hyopneumoniae* (20.1%), *P. multocida* (12.9%), and *A. pleuropneumoniae* (5%) [11].

Below we review the main primary pathogens as defined above, common viruses such as PRRSV, PCV2, swIAV, PRCoV and ADV as well as bacteria like *A. pleuropneumoniae*, *M. hyopneumoniae* and *B. bronchiseptica*. Conversely, other pathogens involved in the PRDC are not presented in the following sections while considered in Additional file 1 presenting the different coinfections' situations.

2.1 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

PRRSV is an enveloped single stranded positive RNA virus belonging to the *Arteriviridae* family. Two different species, PRRSV-1 (also known as Betaarterivirus suis 1), from European origin, and PRRSV-2 from American origin, are now distinguished [14]. This enveloped virus replicates mainly or exclusively in macrophages such as Alveolar Macrophages (AMs), but also macrophages from the nasal mucosa and Pulmonary Intravascular Macrophages (PIMs) [15, 16]. In vitro, PRRSV can also replicate in cultured monocytes and monocyte-derived cells including macrophages [17] and in vitro-derived Dendritic Cells (DCs) generated either from Bone Marrow hematopoietic cells (BMDCs) or blood Monocytes (MoDCs), depending on the in vitro culture conditions [18, 19]. However, such in vitro generated DCs are not representative of in vivo primary DCs which do not seem to be permissive to viral replication [20]. In fact, MoDC and BMDC (at least when generated using Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF) although possessing functional overlaps with the DC family, do not represent *bona fide* DCs, which represent an own lineage of hematopoietic cells distinct from the monocytic lineage [21]. Different cell surface molecules are involved in PRRSV entry and infection of cells: heparan sulfate, porcine sialoadhesin—also known as sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin 1 (Siglec-1), Siglec-10, CD151 and CD163 [22, 23]. Heparan sulfate is a GlycosAminoGlycan (GAG) that seems to play a modest or secondary role in PRRSV infection since the blocking of this receptor on AMs induced only a mild decrease in PRRSV infectivity. Moreover, this effect was not observed with all the PRRSV isolates tested, suggesting that the involvement of heparan sulfate depends on the antigenic diversity of PRRSV [22]. Siglec-1/CD169 is a member of the sialic acid-binding lectins (Siglecs) family and is expressed on macrophages [22] and Siglec-10 has been identified as an alternative receptor to Siglec-1 [23]. Binding of PRRSV to Siglecs induces its internalisation by clathrin-mediated endocytosis. Expression of

recombinant porcine sialoadhesin is sufficient to induce the internalisation of PRRSV by non-permissive cells, but not replication [24]. CD163 is a scavenger receptor involved in PRRSV infection [22]. Its expression on non-permissive cells makes them susceptible to infection with PRRSV and allows productive replication of the virus [22]. Moreover, CD169-KO animals are still susceptible to PRRSV-2 infection [22], whereas CD163-KO animals are resistant to PRRSV-1 and PRRSV-2 [25, 26]. Finally, MYH9 has been recently identified as an indispensable partner of CD163 for PRRSV cell entry for both PRRSV-1 and PRRSV-2 [27].

PRRS clinical signs can be nearly absent to severe depending on the considered PRRSV species and strains. When observed, there are, amongst the most frequent, lethargy, dyspnea, tachypnea, as well as a reproductive disease [16]. PRRSV can persist in infected pigs for several months after the initial infection particularly in lymphoid tissues and has the ability to alter the host's immune system to escape it (for review see [16]). PRRSV interferes with the porcine innate immune response through downregulation of type I Interferons (IFNs—IFN α and IFN β mostly), which are cytokines known for their antiviral properties [28]. PRRSV-infected macrophages also had a reduced capacity to produce the pro-inflammatory cytokines TNF α and IL1 β [28] and the production of the anti-inflammatory cytokine IL10 was found enhanced during infection [29]. Nevertheless, the role of cytokine modulation during PRRS is unclear considering that the effects appeared to depend on the PRRSV species, as well as on the PRRSV isolates, since opposite results can be found with different PRRSV strains [30, 31]. In fact, some PRRSV-2 isolates were shown to enhance IFN α production while other PRRSV-1 isolates suppressed it. Results seemed also very variable for the immunoregulatory IL10 along different isolates of PRRSV-1 [30, 31], making general conclusions about how PRRSV alters innate immune responses difficult. PRRSV impact on adaptive cellular immunity seems also to be highly variable according to the species and the strain [20]. Conversely, whereas non-protective antibody response against the viral nucleocapsid is found within a week post-infection, neutralizing antibodies appearance is highly delayed for all PRRSV species and strains, appearing only after 3 or 4 weeks of infection and peaking even later [16].

2.2 Porcine circovirus type 2

PCV2 is a naked circular single stranded DNA virus belonging to the *Circoviridae* family and responsible for Porcine CircoVirus Disease (PCVD). The attachment of PCV2 to target cells occurs through chondroitin sulfate B and probably other receptors [32]. Internalisation

is not fully known but it does not seem to involve a specific receptor and the GAGs could mediate internalisation and binding to the target cells [33]. Most of the time the infection is subclinical but in some circumstances such as coinfections with other respiratory pathogens it can cause the Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), clinically characterized by wasting respiratory disease, and enteritis [34]. Infection with PCV2 can occur in utero, resulting in stillborn piglets and mummified fetuses, or death at different ages after birth [34]. In young and older animals, PCV2 was found in cells expressing monocytes (CD14⁺), and T and B cells (CD4⁺, CD8⁺, IgM⁺) markers [35]. Further results showed that active replication of the virus was supported by T and B cells, with enhanced replication in proliferative cells [36]. In vitro, PCV2 can also infect many other cell types including endothelial cells, gut epithelial cells, fibrocytes, and DCs [37]. In DCs the virus seems to persist and remain infective for a prolonged period without replication indicating that these cells might serve as a vehicle for virus spread in the host [38]. PMWS is characterized by the depletion of lymphoid cells affecting T cells, B cells, and NK cells [39]. This lymphopenia was also associated with impaired responses of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) to mitogen stimulation with lower levels of IL2, IFN γ , and IL4 production compared to PBMCs from non-infected pigs [40]. Another feature of PMWS is an elevated level of IL10 found in lymphoid organs, especially in the T cells rich areas [41]. IL10-mediated immunosuppression could play an important role in the PCV2 infection and the development of PMWS. PCV2 has also the ability to alter the innate immune response [42]. Even though the virus does not productively infect DCs, evidence shows that it can interfere with the normal plasmacytoid DCs (pDCs) response. Upon stimulation with CpG-ODN, pDCs' ability to produce IFN α and TNF α was impaired in cells previously infected with PCV2 [43]. PCV2 DNA isolated from infected cells induced the suppression of pDC IFN α production [43].

2.3 Swine influenza A virus

Influenza A viruses are enveloped single stranded negative RNA viruses belonging to the *Orthomyxoviridae* family. These enveloped viruses can infect a broad range of hosts, with pigs being one of their natural hosts (for a review see [44]). The three main IAV subtypes encountered in pigs are H1N1, H1N2, and H3N2 [44], but many genetic lineages and antigenic variants within these subtypes are co-circulating in the pig population worldwide. Subclinical infections with swIAVs are common in pigs, but they can also induce a disease similar to what is observed in humans, with upper respiratory tract

distress associated with fever, cough, rhinitis, high morbidity, and low mortality [44]. The main targets of swIAVs are epithelial cells of the respiratory tract but IAVs can also non-productively infect alveolar macrophages [45]. Two major glycoproteins are present at the surface of the virus: HemAgglutinin (HA) and NeurAminidase (NA). Binding of HA with the sialic acid molecules at the surface of the host cells will induce the endocytosis of the viral particle [44]. The NA molecule plays the main role in the budding of the virus by removing the sialic acid, allowing the release of neoformed virus particles from the infected cell [44]. The innate response against the virus includes production of high levels of pro-inflammatory cytokines such as IFN α , TNF α , and IL6. DCs, in particular pDCs play an important role in this response [46]. An important observation was that the production of these cytokines correlated to the viral loads and the severity of the disease. Infection with swIAV induces cellular and humoral specific immune responses in pigs recovering from the disease and the serum IgG and the mucosal IgA can protect the animal from re-infection [44]. NS1 and PA-X are the main viral proteins that alter the innate immune response, mainly by blocking the type I IFN response [47] as well as the NLRP3 inflammasome activation [48] in infected-epithelial cells and alveolar macrophages. Finally, the main mechanisms through which the swIAV escapes the adaptive host immune system are the antigenic drift and the antigenic shift concerning mainly HA and NA which are also the two major antigenic proteins expressed on the surface of the virus and against which the neutralizing humoral response is directed [44].

2.4 Porcine respiratory alphacoronavirus

PRCoV is an enveloped single stranded positive RNA virus belonging to the *Coronaviridae* family. In pigs, four *Alphacoronavirus*, one *Betacoronavirus* and one *Deltacoronavirus* have been described [49, 50]. Thus, most of the porcine coronaviruses are from the genus *Alphacoronavirus*. The only respiratory porcine coronavirus, PRCoV, is a variant of Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) where a large 5' region deletion (nucleotides 621–681) in the Spike gene of the virus altered the tropism and the virulence. Even if pigs have been shown to be susceptible to the first SARS-CoV (serological evidence and isolation of the virus in a pig farm in the Xiqing County of Tianjin, China) [51] they have not been successfully experimentally infected, at this stage, by SARS-CoV-2 [52]. PRCoV uses aminopeptidase-N (CD13) domain IV to enter cells [53] and replicates to high titers in the lungs (1×10^7 – 10^8 Tissue Culture Infectious Dose 50—TCID₅₀) specifically in type 1 and 2 pneumocytes. Moreover, it can infect epithelial cells

of the nares, trachea, bronchi, bronchioles, alveoli, and, occasionally, alveolar macrophages [49]. Infections with the PRCoV are usually subclinical, but there is variation between strains and some can induce a more severe disease. PRCoV can infect pigs of all ages by direct contact transmission or aerosol [49]. The clinical signs are associated to the respiratory system and are mild to severe—bronchointerstitial pneumonia—depending the strain and the context (environmental and management factors as well as the presence of other pathogens).

2.5 Aujeszky's disease virus or PseudoRabies Virus (PRV)

Suid herpesvirus 1, usually known as PRV or ADV is the responsible agent of Aujeszky's disease in pigs. It is a double stranded enveloped DNA virus from the *Herpesviridae* family and *Alphaherpesvirinae* subfamily targeting respiratory and/or genital mucosae for its replication [54]. ADV has a very broad host range varying from domestic animals like pigs, cattle, goats, sheep, cats and dogs to wild animals such as ferrets, foxes, hares, raccoons, and wild deer, and where it induces different diseases [54]. Infected animals usually show fever, sneezing, coughing and vomiting accompanied occasionally with typical nervous manifestations like convulsions, aggressiveness and lack of coordination. Mortality rate can reach 100% in suckling piglets while in mature pigs the infection is inapparent or mild [54].

ADV possesses eleven types of envelope glycoproteins playing major roles in the interaction with host cells and the induction of immune response [54]. Viral binding and fusion with the plasma membrane of the target cell—epithelial cells, neurons and alveolar macrophages—are controlled by a cascade of events orchestrated by glycoproteins C (gC), gB, gD, gH and gL. The binding process starts with an interaction of gC with heparin sulfate proteoglycans [54, 55]. Stabilization of this interaction is then assured by the binding of gD to specific cellular receptors known as herpesvirus entry mediators such as HveA (TNFRSF14), HveB (PRR2, nectin 2), HveC (PRR1, nectin 1), HveD (PVR, CD55), and 3-O-sulfated heparin sulfate [54, 56]. At this stage, Tyrosine-based or dileucine-based endocytosis in parallel with clathrin-mediated endocytosis occur by the mediation of gB, gH and gL, leading to the penetration of the capsid and the tegument into the cellular cytoplasm. Finally, the interaction of the capsid with dynein leads to the release of viral DNA into the cellular nucleus after a transport along microtubules from the periphery to the nuclear pores [55].

Porcine humoral immune response is induced by ADV and neutralizing antibodies are mainly directed against gC [57]. Specific cell mediated immune responses are also triggered and MHC class I restricted, gC-specific,

cytotoxic cells are induced. ADV also alters the IFN signaling pathway by suppressing STAT1 tyrosine phosphorylation leading to an inhibition of IFN-Stimulated Genes (ISGs) expression [54, 57].

ADV may be involved in the PRDC and can be isolated alone or with other pathogens. Accordingly, a study conducted in Taiwan reported the association of ADV with PCV2 in 10.3% of the evaluated pigs using a multiplex PCR [58].

2.6 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Animals affected with this Gram negative bacterium develop a pleuropneumonia characterized by fibrino-hemorrhagic necrotizing bronchopneumonia and fibrinous pleuritis which can reach a high mortality rate [59, 60]. Although the disease is best known in its acute/peracute forms, subacute and/or chronic presentations with low or no mortality are highly prevalent, especially in the presence of antibiotic treatments. Many herds are subclinically infected without previous or present episodes of clinical disease and in the absence of suggestive lesions at the slaughter house. Animals are, nevertheless, carriers of the pathogen. This happens in several conventional herds which may be simultaneously infected not only with several low/intermediate virulent strains, but also, in some cases, with strains highly likely to cause disease. In the latter case, outbreaks may suddenly appear in the presence of concomitant diseases or as a consequence of changes in management and/or environment [59, 60]. Eighteen serotypes of the bacterium have been described, which can all induce disease, although clear differences in virulence have been described [59, 60]. These bacteria can be found mainly in tonsils of carrier animals; virulent strains have a tropism for the lower respiratory tract where they preferentially bind to ciliated cells of the terminal bronchioli and pneumocytes [59, 60]. Different virulence factors expressed by *A. pleuropneumoniae* are involved in the colonization and the development of the disease. Adhesion to cells could be mediated by type IV fimbriae that are expressed upon contact with respiratory epithelial cells in vitro and during lung infection [59, 60]. Adhesion of *A. pleuropneumoniae* to respiratory epithelial cells also involves the binding of bacterial lipopolysaccharides to glycosphingolipids on the surface of the cells [59, 60]. The formation of biofilm by the bacteria is likely to play an important role in the colonization of the host [61]. After attachment to the target cells, the bacteria can produce four different pore-forming exotoxins (Apx I, II, III and IV) inducing the lysis of alveolar epithelial cells, thus allowing the acquisition of nutrients by the bacteria, but also participating in the development of the lesions [60, 62]. Some of the virulence factors expressed by *A. pleuropneumoniae* interfere with

the host's immune response. The toxins Apx I, II and III induce the lysis of not only respiratory epithelial cells, but also of cells involved in the innate immune response such as macrophages and neutrophils [60, 63]. At lower concentrations, these toxins lose their lytic properties but can still impair macrophages chemotactic activity and their phagocytic abilities [64]. The capsular polysaccharides of *A. pleuropneumoniae* interfere with macrophage phagocytosis and enable resistance to complement-mediated killing [60]. *A. pleuropneumoniae* may also interfere with the antibody response by producing proteases that can degrade porcine IgA and IgG [59, 60].

2.7 *Mycoplasma hyopneumoniae*

This cell wall-free bacterium is considered to play a primary role in PRDC and is the causative agent of porcine Enzootic Pneumonia (EP), a disease with high morbidity but low mortality rates [65]. The main pathological mechanisms involved in *M. hyopneumoniae* infections are: (i) adhesion to the ciliated cells of the tracheal epithelium inducing ciliostasis, loss of cilia and exfoliation, dysregulation of cellular homeostasis (with increased intracellular calcium concentration) and secretion of cytotoxic factors, (ii) alteration of the mucociliary tract, (iii) inflammatory reactions sometimes exacerbated and prolonged, and (iv) manipulation of the innate and adaptive immune responses [65, 66]. Among the adhesins described in *M. hyopneumoniae*, P97 is reported to be a major determinant of cell adhesion [65–67]. Several other adhesins were reported: P102 linked to P97, LppS, LppT, MgPa, P65, P76, P110, P146, P159, and P216 [65, 66]. Most adhesins are transcribed and translated during *M. hyopneumoniae* infection and then undergo post-translational cleavage to result in diverse products on the membrane surface [65, 67, 68]. The diversity of surface proteins can also derive from the variation in the number of repeats in genes encoding adhesins [69]. These mechanisms of antigenic variation enable the bacterium to escape from immune system recognition and to invade the host [66]. Adhesins can also recruit extracellular matrix components (plasminogen, fibronectin and actin amongst others), and therefore can promote invasion and inflammatory response [65, 70].

The immune response induced against *M. hyopneumoniae*, may have a double action: over-activation of the local immune response resulting in a pathologic inflammatory reaction or local immunosuppression explaining the chronic nature of the associated pathologies [65, 66]. Acute *M. hyopneumoniae* infection leads to the recruitment and activation of various innate immune cells, essentially through the involvement of a large range of cytokines: IL1, IL6 and TNF α in lungs; CXCL8, IL1, IL2, IL4, IL6, TNF α and IL10 in Bronchus-Associated

Lymphoid Tissue (BALT) or TracheoBronchial Lavage Fluid (TBLF) [65, 71, 72]. Some of these inflammatory cytokines (TNF α , CXCL8, IL1 β , IL6) are produced chronically in the lungs and play powerful roles in apoptosis (TNF α), differentiation and chemotaxis of neutrophils (respectively, IL6 and IL8), and macrophage activation (TNF α , IL1 β). Chronic infections are typically associated with intense lymphoid hyperplasia [71] and are characterized by an accumulation of IgG- and IgA-expressing plasma cells, CD4⁺ T cells, macrophages and DCs in the BALT of inflamed lung tissue [73]. Involvement of T cell activation in chronic inflammation is also supported by the presence of T-cell cytokines such as IL-2 and IL-4 in bronchoalveolar exudates [72].

In vitro studies conducted with macrophages cocultured with *M. hyopneumoniae* highlighted a strong activation of inflammatory pathways inducing the production of cytokines and chemokines, and expression of receptors or pathways inducing cell apoptosis [65, 66, 74, 75]. Moreover, *M. hyopneumoniae* is described as an inhibitor of macrophages phagocytic activity, which may explain the chronicity of *M. hyopneumoniae* infections and the greater host susceptibility to other pathogens [65, 66, 74].

Mycoplasma hyopneumoniae was found to activate costimulatory molecule expression on *bona fide* DCs with poor TNF α production, contrasting with monocytes. Interestingly, a strong mitogenic activity for B cells was observed [76]. Altogether, these data indicate that *M. hyopneumoniae* is well sensed by the innate immune system, but the presence of immune evasion mechanisms targeting antigen presenting cells remains a possibility that needs further investigations.

Antibody responses after infection develop slowly and do not appear to correlate with protection [65, 66]. The literature on *M. hyopneumoniae* infections coupled with information from mouse models indicates that adaptive immune responses represent a fragile balance between pathogenic and protective Th- cell responses, probably belonging to the Th1 or Th17 types [65, 66].

2.8 *Bordetella bronchiseptica*

This aerobic Gram-negative bacterium can be found in the respiratory tract of several animal species and it presents a worldwide distribution in the porcine rearing [77]. *B. bronchiseptica* has a strong tropism for ciliated cells from the respiratory tissue and is mostly detected in the apical portion of the ciliated cells of turbinates, trachea and lungs [77, 78]. It can also be found in the cytoplasm of neutrophils and macrophages and rarely in the alveolar lumen associated with small tufts of cilia [77, 78]. Hence, infected pigs show cilia loss in the bronchial and bronchiolar epithelium associated with multifocal

erosion, fibrosis, and hyperplasia. Neutrophil infiltrates are noted in the peri-conchal meatus and the submucosa of the bronchioles and alveoli, while lymphocyte and plasma cell infiltrations occur at the level of the *lamina propria* [77, 78].

Cell adhesion of *B. bronchiseptica* is a multifactorial process involving two main virulence factors; Filamentous HemAgglutinin (FHA) and PeRtactiN (PRN) [77, 79]. The expression of both adhesins is controlled by the *Bordetella* virulence genes (Bvg)AS signal transduction system. FHA is an adhesin with several binding domains including a carbohydrate- recognition domain responsible of the adhesion to macrophages and ciliated epithelial cells, a heparin-binding domain that mediates the binding to sulfated polysaccharides, and an Arg-Gly-Asp domain (RGD) regulating the InterCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) by epithelial cells after interaction with the NF- κ B signalling pathways [79]. This RGD domain is also present in the structure of PRN and contributes to the binding process [77, 79]. On the other hand, non-opsonic adhesion mechanisms play a role in binding to the host cells such as carbohydrate-specific mechanisms and those involving sialic acid-containing compounds [77].

Virulence of the bacteria depends on the strains; therefore, clinical signs can be different going from sneezing and transient nasal discharge for moderate and non-toxic strains to bronchopneumonia and atrophy of the nasal turbinate bones for virulent strains, especially if they are associated to other bacteria such as *P. multocida* [77]. Thus, *B. bronchiseptica* is usually described as primary lung pathogen in young pigs where it causes necrohemorrhagic bronchopneumonia whereas in older pigs this bacterium is mostly known as an opportunistic pathogen contributing to the PRDC [77]. The immune response against *B. bronchiseptica* is mainly triggered by the different toxins expressed such as adenylate cyclase, tracheal cytotoxin and DermoNecrotic Toxin (DNT).

3 Coinfections and superinfections and the resultant consequences for the porcine host

3.1 Selection and exclusion criteria for considered studies

In the following section and Additional file 1, we have used the published studies evaluating multiple infections including viral-viral, bacterial-viral, viral-bacterial and bacterial-bacterial respiratory coinfections and superinfections in swine. Both in vivo and in vitro studies comparing single to multiple infections were included. Studies evaluating vaccinations and the development of diagnostic techniques such as ELISA or qPCR were excluded as well as trials testing antiviral or antibacterial molecules when there was no clear comparison between

single and multiple infections. An attempt to present a synthetic view of coinfections is depicted in the heat maps (see Figures 1, 2, 3). However, we recommend readers to refer to Additional file 1 for each coinfection couple to get a more detailed view.

In these heat maps, we were interested in the effect of the first pathogen on the multiplication of the second one (named “assessed pathogen” in the figures) and on the host immune response and/or clinical signs. These effects were evaluated and a grade from -5 to +5 was given to every pathogen depending on the intensity of its impact on the multiplication of the second agent and on the immune response or on the clinical signs. Negative grades were given to pathogens decreasing the multiplication of other pathogens, while positive grades were given to those inducing an increase. Similarly, negative grades were attributed to pathogens with a tendency to decrease clinical signs or immune response related to the other pathogen. Positive grades were given in case of an increase. The sum of the grades was calculated if the same pathogen combination was evaluated in several studies except in the case of discordant results. This

grading was represented in the following heat maps and the number of the identified studies for the same pathogen combination is shown on the maps. In the heat maps, other pathogens, that are less associated to PRDC such as *G. parasuis*, *M. hyorhinis*, *M. flocculare*, *P. multocida*, and *S. suis* or even not considered as respiratory pathogens like *Staphylococcus aureus*, Classical Swine Fever Virus, Hepatitis E Virus, Porcine RubulaVirus, PPV, and Torque Teno sus Virus 1 have also been included. Indeed, these pathogens can also impact the outcome of respiratory infections and deserve, at least, to be mentioned.

3.2 The different types of coinfections

3.2.1 Virus-virus

Viral/viral respiratory coinfections have always had an important role in the porcine respiratory disease complex [1]. Several studies assessed the presence of two or more viral pathogens in pigs showing respiratory clinical signs in farms located in endemic regions [7, 8, 13]. The main viruses contributing to the porcine respiratory disease are swIAV, PRRSV, PCV2, and to a lower extent the PRCoV and the ADV. Due to their fast-spreading and

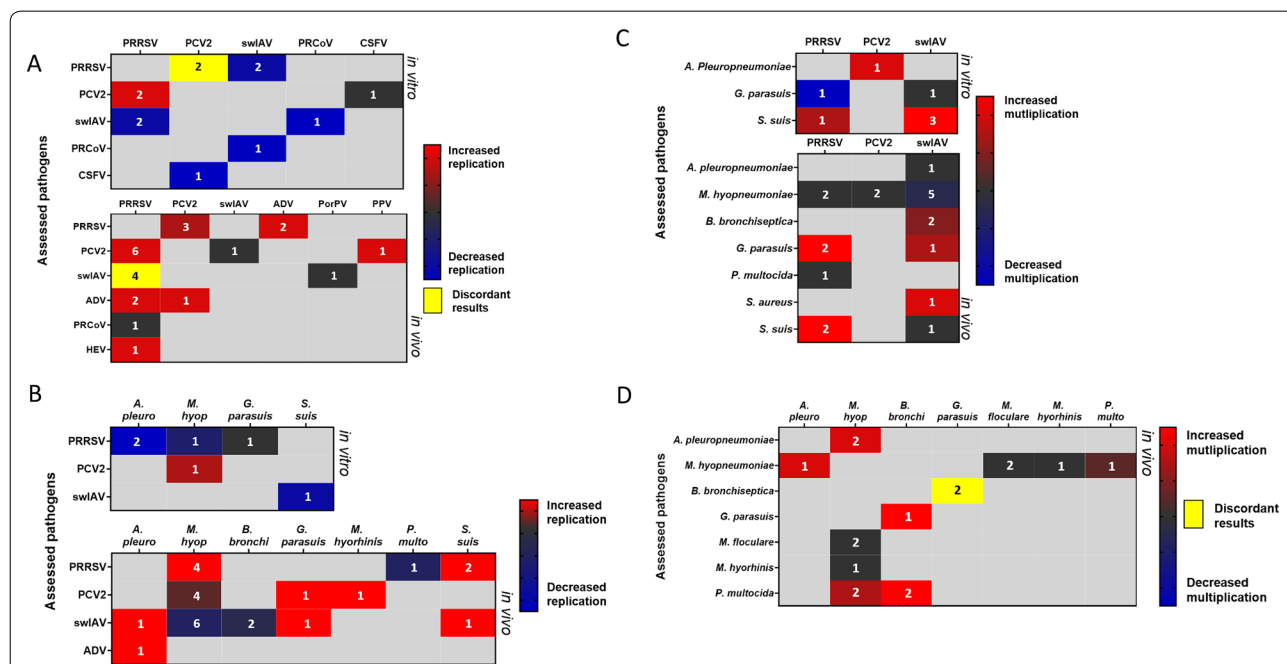
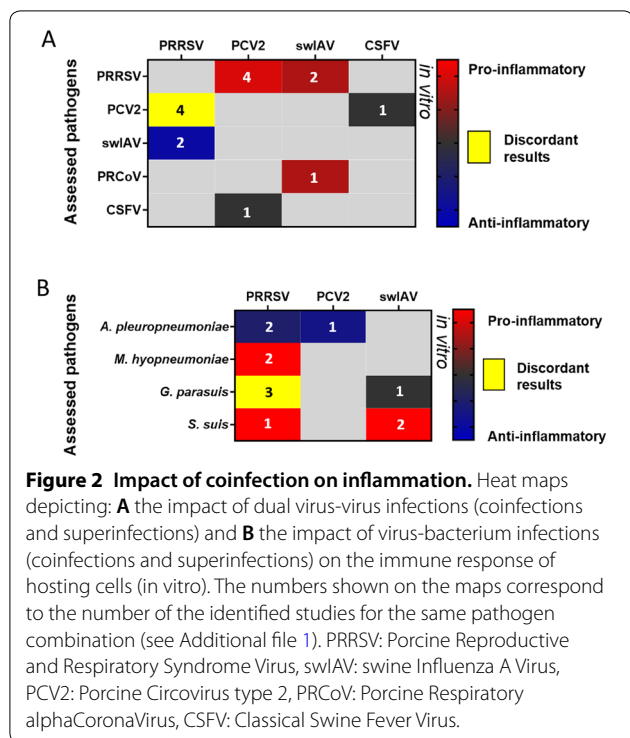


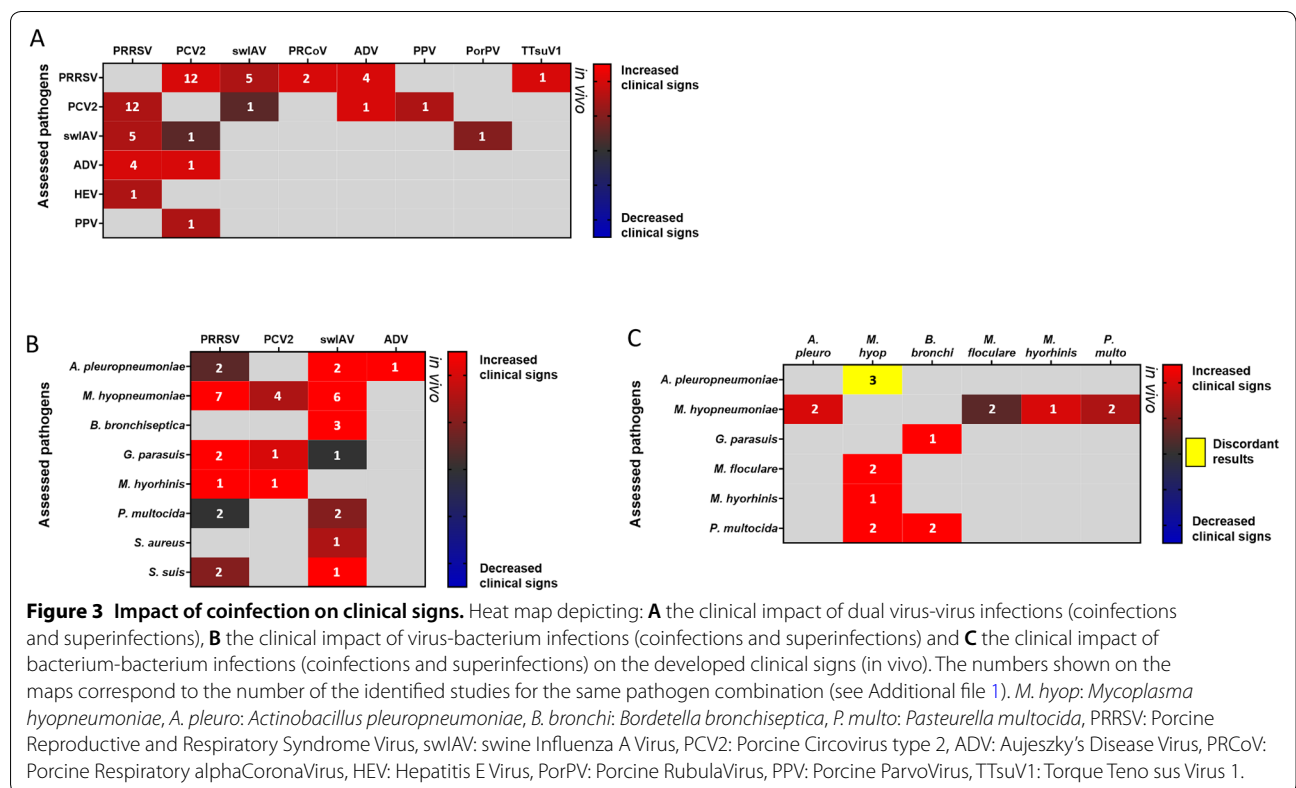
Figure 1 Impact of coinfection on multiplication/replication of the microorganisms. Heat maps depicting: **A** the impact of a secondary viral infection (top) on the replication of the virus (side) responsible of the primary infection in virus-virus dual infections (coinfections and superinfections) in vitro (up) and in vivo (down). **B** the impact of a bacterial infection on the replication of the infecting virus in virus-bacterium dual infections (coinfections and superinfections) in vitro (up) and in vivo (down). **C** the impact of a viral infection on the multiplication on the infecting bacteria in virus-bacterium dual infections (coinfections and superinfections) in vitro (up) and in vivo (down). **D** the impact of a secondary bacterial infection (top) on the multiplication of the bacteria (side) responsible of the primary infection in bacterium-bacterium dual infections (coinfections and superinfections) in vivo. The numbers shown on the maps correspond to the number of the identified studies for the same pathogen combination (see Additional file 1A and B). PRRSV: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, swIAV: swine Influenza A Virus, PCV2: Porcine Circovirus type 2, ADV: Aujeszky’s Disease Virus, PRCoV: Porcine Respiratory alphaCoronaVirus, CSFV: Classical Swine Fever Virus, HEV: Hepatitis E Virus, PorPV: Porcine RubulaVirus, PPV: Porcine ParvoVirus.



their economic consequences, some viruses were more studied than others in the last 20 years, especially PCV2, PRRSV, and swIAV as shown in Additional file 1A and B. We will thus put more emphasis on these three viruses as causes of primary infections.

Many in vivo studies were carried out to assess the severity of the clinical signs and the development of the microscopic/macroscopic lesions. This approach enabled a comparison between coinfection/superinfection and single-infection conditions. Then, viral interference was progressively more frequently measured as a way to better understand the consequences of coinfections. In the last decades, the strong development of molecular biology and various tools enabled the evaluation of the immune response developed following polyviral infections.

In Additional file 1, the selected studies that were carried out on viral coinfections are presented from the oldest in vivo experiments to the latest in vitro and ex vivo experiments (Additional file 1A and B). This data synthesis highlights the major impact of PRRSV primary infection, which can both increase the titre of the following virus (PCV2, Hepatitis E Virus—HEV) in vitro [80] and in vivo [81–83] (Figure 1A), but can also worsen the clinical score associated to the disease (Figure 3A). Interestingly, even when the PRRSV does not increase the viral production of the other virus, as observed in coinfections



involving swIAV [84] or PRCoV [85] (Figure 1A), it can also worsen the associated clinical signs. SwIAV and PCV2 as primary infectious agents have been less studied. However, it can be observed that swIAV can interfere with other virus productions (PRRSV and PRCoV) [85, 86] whereas PCV2 has some detrimental impact on the clinical outcome of secondary viral infections (PRRSV, swIAV, and PPV) [87–89] (see Additional file 1 and Figure 1A). Then, regarding the inflammation induced in coinfection conditions, various outcomes were observed depending which viruses were considered (Figure 2A).

3.2.2 Bacterium–virus and virus–bacterium

Many in vitro and in vivo experiments, with different bacterium-virus and virus-bacterium combinations, have been performed to identify the underlying mechanisms of the PRDC (see Figures 1B, C, 2B, C, and 3B). The main studies are presented in Additional file 1C and D.

Bacterium-viral coinfections can also involve various primary respiratory pathogens. Among them, the most frequently studied bacterium is *M. hyopneumoniae*, a pathogen that induces a chronic respiratory disease and can influence the outcome of a subsequent viral infection. However, mycoplasma infection needs to be already well established in the respiratory tract at the time of the viral infection to potentiate it. Indeed, *M. hyopneumoniae* inoculated to pigs simultaneously or shortly before the virus did not strongly impact the severity of the viral infections (PCV2, swIAV, PRRSV) [90–92], while its impact was clearly evidenced when inoculated 3 weeks before viral infections [93].

It is well-known that viral infections can induce an ideal environment for a bacterial superinfection through different mechanisms such as the destruction of the epithelial barrier, the over-expression of the receptors involved in the bacterial adhesion to the cells, and the alteration of the host immune response [1, 2, 94, 95]. The swIAV infection has been shown, for instance, as a way to facilitate the colonization of epithelial cells by *S. suis*, but only for the serotypes containing sialic-acid in their capsule [96]. The swIAV infection induces a loss of ciliated cells leading to the impairment of the mucociliary clearance function, but induces also the presence of the viral HA on the surface of infected cells that interacts with the sialic acid of the bacterial capsule, leading to increased adherence of *S. suis* [96, 97]. Although these swIAV effects on *S. suis* have been clearly shown in vitro, no clear in vivo impact of swIAV infection on *S. suis* pulmonary load has been described [98]. It was clearly shown that the presence of both pathogens significantly induces more inflammation than single infections [98, 99].

Overall, studies carried out in pigs showed that a bacterium-virus or a virus-bacterium coinfection frequently

induces an aggravation of pulmonary lesions (Figure 3B) and a higher inflammation (Figure 2B) and immune response, with increased production of pro-inflammatory cytokines. In many bacterium-virus and virus-bacterium associations, this worsened outcome seems to be the result of additive effects from both pathogens rather than a real synergy [100, 101]. However, a potentiation of the viral infection by bacteria can also be observed in other cases, such as in the *M. hyopneumoniae*-PRRSV coinfection [102]. In that case, higher amounts of PRRSV genomes were detected in lymphoid tissue and blood [102] and a slower viral clearance was observed [75] (Figure 1B), suggesting that the recruitment of immune cells in the lung parenchyma upon established *M. hyopneumoniae* infection may provide a steady supply of susceptible cells for PRRSV [1]. Then, in porcine AMs and in the “African green monkey” (originally described as porcine origin) St-Jude Porcine Lung (SJPL) cell line, PRRSV infection has been shown to be blocked by a pre-infection with *A. pleuropneumoniae*, this antiviral activity being due to the *A. pleuropneumoniae* metabolites [103] (Figure 1B). Given the fact that in vivo studies involving PRRSV and *A. pleuropneumoniae* did not always investigate the impact of an *A. pleuropneumoniae* pre-infection on the subsequent PRRSV infection [104, 105], as done in experiments performed in vitro [103], it cannot be easily concluded if this interference would be observed in the target species. However, in vivo, PRRSV-*A. pleuropneumoniae* interactions were reported as absent or mild [104, 105] (Figure 3B).

3.2.3 Bacterium–bacterium

In virus-bacterium coinfections, the dogma usually encountered is that viruses play an immunomodulatory role, which favors bacterial superinfections. Nevertheless, a pre-disposing effect is also described for *M. hyopneumoniae*, which promotes viral but also bacterial superinfections [65] (Figure 1D). Few studies of experimental coinfections or superinfections with *M. hyopneumoniae* and/or other bacteria involved in PRDC were performed compared to coinfections involving viruses. These studies are reported in Additional file 1E. Overall, these coinfections or superinfections induce more clinical signs and lung lesions and poorer technical performances when compared to single infections with the same infectious pathogens (Figure 3C). The bacterial-bacterial coinfections are also responsible for immune response alterations (for reviews see [106, 107]). For example, macrophages from pigs infected by *M. hyopneumoniae* decrease their phagocytosis capacity against *A. pleuropneumoniae* [60, 65]. *M. hyorhinis* and *M. flocculare*, two mycoplasmas commonly co-isolated with *M. hyopneumoniae* in gross pneumonia-like lesions, may

also impact the immune response by inducing the cytotoxicity of immune cells and/or the secretion of cytokines affecting its outcome [108]. Co-stimulation of porcine BMDCs with *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* induces a strong IL12 production. In this last in vitro model, *M. hyopneumoniae* associated with *M. flocculare* reduces TNF α production compared to BMDCs stimulation by *M. flocculare* alone producing a TNF α concentration greater than that observed after stimulation with *M. hyopneumoniae* alone and *M. hyorhinis* alone [108]. Therefore, *M. flocculare* might play an initial role in pulmonary inflammation by inducing the production of TNF α by resident myeloid cells. Supplementary investigations will be needed to elucidate the role of this cytokine in the pathogenesis of the disease [108]. Other examples of bacterium-bacterium in vivo coinfections are presented in Additional file 1E.

3.3 Mechanisms of coinfections interferences

Regarding coinfections and superinfections, most studies assessed the clinical outcome of the process but less is known about the mechanisms of interactions between pathogens and the consequences for the pathogens themselves, the infected cells and more generally for the host.

The outcome of dual infection is variable depending on the antagonism, neutrality or synergy between the infectious agents. On the host side, coinfection can make the host response ineffective, and vice versa. If we look now at the possible interactions that can occur between pathogens we have to consider the nature of the infectious agents (summary provided in Figure 4). Different situations can be observed and coinfections can involve virus with virus, bacterium with virus and vice versa, and bacterium with bacterium.

3.3.1 Virus-virus interactions

Regarding virus-virus interactions, consequences are diversified and many studies looking at virus replication in coinfection situations have been carried out [2]. The first consequence of coinfection could be the so-called viral interference, a situation whereby one virus interferes with the replication of the other one making the cells resistant to the superinfecting virus [109].

The most common way for viral interference is indirect and based on the production of type 1 and 3 IFNs which induce the expression of ISGs after interacting with their cognate receptors [110, 111]. These proteins then activate numerous mediators of the cellular antiviral system that may non-specifically block the replication of viruses.

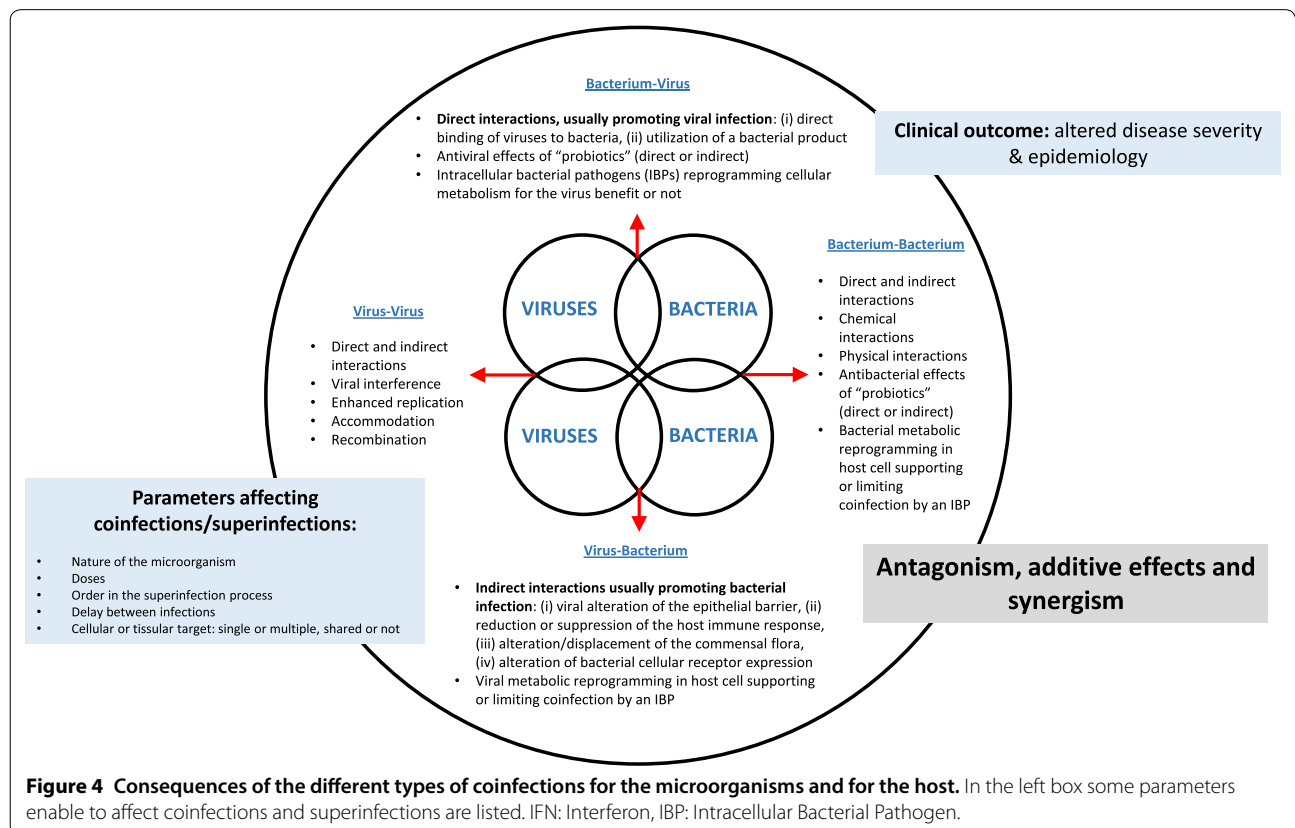


Figure 4 Consequences of the different types of coinfections for the microorganisms and for the host. In the left box some parameters enable to affect coinfections and superinfections are listed. IFN: Interferon, IBP: Intracellular Bacterial Pathogen.

They may also interfere, to a certain extent, with bacterial multiplication since IFN can also be induced by Intracellular Bacterial Pathogens (IBPs) or some extracellular bacteria [107, 112]. Nevertheless, in some situations type 1 IFNs can also increase the host susceptibility to subsequent bacterial infection [113] through impaired macrophage recruitment with a reduced CXCL1 and CXCL2 transcription [114] and a reduced IL17 [115] production. Then, there is also the non-interferon-mediated viral interference (or intrinsic interference) which is a cellular state of resistance induced by the virus to new viral infection by closely related or unrelated viruses [116]. Various mechanisms are described to explain this cellular state of direct or indirect resistance (for examples see [2]). In this type of interference, which can occur between viruses but also between viruses and bacteria [107, 117], there is a competition between pathogens for the metabolites and all the host factors that allow their multiplication. Besides the mechanisms involving a competition for common cellular factors, there are also several other mechanisms of interference described. These relies on viral Defective Interfering (DI) particles [118], RNA interference (RNAi) [119], non-specific double stranded RNA (dsRNA) [120] as well as trans-acting proteins [121]. Interference can occur at specific steps or multiple steps of the viral replication cycle (attachment, penetration, genome replication and/or budding) and can be direct or indirect. Inhibition of superinfection (superinfection exclusion and superinfection suppression) is one of several consequences that can be observed in the interference between related and unrelated microorganisms. In superinfection exclusion, an established infection interferes with a subsequent, closely related infection [2, 122]. An example of this phenomenon in pigs is the exclusion of highly virulent classical swine fever virus strain Margarita in wild boars persistently infected with this virus upon a challenge infection with the same Margarita strain [123]. Superinfection suppression is a quite close concept where this time persistently infected cells resist to a challenge with a heterologous virus [2]. Furthermore, when the host immune response—innate or adaptive—is considered in the study of the complex interactions taking place in viral coinfections, additional mechanisms of indirect interference linked to cellular and humoral cross-protection—resulting from a first viral contact with a wild-type or a vaccine strain—can be described.

Conversely, in some situations, viral coinfections can directly or indirectly result in enhanced replication and virulence for one or both pathogens as observed in several studies involving porcine viruses [80, 83, 124–126]. In other cases, coinfection/superinfection has no effects on virus replications and the viruses can coexist in a relation called accommodation [2]. Besides consequences in

terms of viral replication, there are also consequences for the genetic of the viruses and their evolution through events of recombination between closely related viral genomes. Recombination, the parameters influencing it and its consequences were reviewed in RNA and DNA viruses [127, 128]. Then, as a result of all these possible interactions between viruses, the severity of the resulting disease and its epidemiology can be altered as exemplified in Additional file 1. In the pig studies, most often, however, the exact mechanisms controlling interactions between viruses were not elucidated.

3.3.2 Bacterium–virus and virus–bacterium interactions

Several mechanisms explaining bacterium–virus and virus–bacterium interactions have been identified (for reviews see [1, 94, 117]). The interactions can have either a positive or a negative impact on both pathogens depending on the bacterial and viral species involved. Usually, when the interactions are direct they promote viral infection without affecting the bacterial species [1, 94, 117]. Examples of these direct interactions are (i) direct binding of the virus to a bacterium or (ii) the utilization of a bacterial product by the virus. An example of direct interactions in the respiratory tract is the cleavage of the IAV HA into HA1 and HA2 by a *Staphylococcus aureus* protease helping the viral particle to become infectious [129]. On the contrary, when interactions are indirect they often provide an advantage to bacterial infections. Four mechanisms dealing with indirect interactions have been described: (i) viral alteration of the epithelial barrier, (ii) reduction or suppression of the host immune response, (iii) viral alteration/displacement of the microbiota, and (iv) virus-induced alteration of bacterial cellular receptor expression [94]. All these mechanisms can operate together for the benefit of the superinfecting bacteria. A typical example of these indirect interactions is provided by PCV2 and swIAV and porcine pathogenic bacteria such as *A. pleuropneumoniae* [130] and *S. suis* [96, 97, 131] where the bacteria benefit from the prior viral infections. However, bacteria can also directly benefit from a previous viral infection as observed in a study demonstrating that *Staphylococcus aureus* was able to bind viral HA [132]. The consequence of that binding was an enhanced bacterial internalisation by two mechanisms: (i) binding to HA exposed at the surface of infected cells, and (ii) binding to free extracellular virions.

In some other situations, non-pathogenic bacteria can also directly or indirectly protect the host from viral infection as typically observed with probiotic bacteria which can show antiviral activity through the binding/capture of the viruses and/or the competition for cell adhesion (for a review see [117]). This type of interaction

has been frequently observed with enteric bacteria [117] and an example in pigs is the reduced infection of IPEC-J2 cells by vesicular stomatitis virus after pre-incubation of the cells with multiple probiotic bacteria [133]. An intriguing relationship is occurring between IBP and viruses where metabolic reprogramming in host cells triggered by viruses might support or conversely limit coinfection by an intracellular bacterial partner (for a review see [107]). Different possibilities can be identified in that type of interaction [107]: (i) the first pathogen can reprogram cellular metabolism related to cellular immunity and decrease the defense against the other pathogen, (ii) the metabolic changes triggered by the first pathogen can facilitate the adhesion, the penetration, and the replication of the other, and (iii) the coinfection transform the active replicative state of the first pathogen into a stable persistent state. The first possibility associated to a decrease of the cellular defense is a commonly accepted mechanism [134] while the second and the third possibilities are less experimentally demonstrated [107].

3.3.3 Bacterium–bacterium interactions

Looking at bacterium–bacterium interactions, they are extremely complex to assess because of the large diversity of the bacterial world and because little is known about the mechanisms underpinning these interactions during infections. Moreover, it is now also clear that intestinal and respiratory microbiomes affect the interactions between pathogenic bacteria and the porcine host [135]. Some examples of the complex interactions occurring in bacteria–bacteria coinfections are presented in Additional file 1E, but little is known about the mechanisms controlling these interactions. However, some mechanisms were provided above and interesting reviews dealing with that subject were published recently [106, 107] discussing the possible direct interactions between bacteria—mainly chemical and physical. Indirect interactions between bacteria were not reviewed in these articles but were discussed to some extent in other review papers focusing on polymicrobial infections [1, 136].

3.4 Limitations of coinfection studies

The first observation coming from this review must be, even if several studies have been carried out on the subject, a lack of data about some specific coinfections and many discrepancies between studies. For instance, there are only a few in vivo studies about PCV2 in virus/virus coinfections and about PCV2 and PRRSV in virus/bacterium coinfections (Additional file 1 and heat maps in Figures 1, 2, 3). Discrepancies are not surprising because of the definition of coinfection is not always the same between studies in addition to huge variations in the coinfection parameters amongst studies.

In this review we focused on experimental (in vivo and in vitro) coinfections, it is worth to underline that these studies are inspired by field veterinarians and epidemiologists observations. However, the definition of epidemiologist coinfection can also vary between studies. Indeed, in some cases there is concomitant direct identification of two microorganisms in the same animals, sometimes in the same farms, while in other cases it is just an indirect identification of the microorganisms' presence at some points through indirect serological assays. Moreover, as stated before, the term coinfection is sometimes used to describe some situations of superinfections where the delay can be significant.

Regarding the experimental parameters, the Multiplicities Of Infection (MOI), the strains, the potential delays between successive infections, the routes of inoculations, the types of cellular hosts considered (more or less susceptible to one of the microorganism), the genetic background (breeds) and the sanitary status (specific pathogen free or conventional breeding) of the pigs, and the readout to assess coinfection outcome varied a lot between studies. To fully compare studies, a standardization of the assays would be needed. Interestingly also, whereas in vitro studies' usefulness is not in question, it is important to underline here that in vitro observed interplay between pathogens cannot be automatically applied in vivo. For instance, whereas *M. hyopneumoniae* decreases the PRRSV titre in vitro [75], it increases PRRSV shedding in vivo and indeed worsens the clinical signs upon coinfection [102]. Consequently, the use of intermediary settings, such as co-culture of different cell types (see [2] for examples), Precision Cut Lung Slices (PCLS) [137] or organoids [138], could help to understand the complexity of coinfections in the respiratory tissue. In vitro approaches usually consider one or a few cell types with some limitations during the evaluation process of the coinfection consequences. Some viruses can contribute to the elimination of other viruses just because of their ability to replicate faster on a particular cell type [139]. Thus, results obtained in vitro cannot mimic the field situation when both agents coinfect the same pig, providing inaccurate conclusions about the coinfection dynamics. Under such circumstances, pathogens may simply have different host cells and no longer be under direct competition for resources [140]. Besides the different interactions that infecting agents can have between them through a competition to resources, studies showed clearly that the immune system and the immunological responses can highly affect these interactions by inducing the competitive power of a pathogen or abolishing it and making it less competitive on the resource [141, 142]. The effects of the immune system (especially humoral parameters) are often not taken

into consideration in selected in vitro models [140]. On the other hand, in vivo coinfection experiments have to deal with numerous constraints (health status of the animals used, cost, husbandry, and ethics amongst others) and therefore are not always easy to perform. Hence, although in vivo experiments are required in this very complex field, they surely need to be combined to in silico/in vitro/ex vivo analyses of potential interactions between pathogens. Moreover, multiple parameters of the coinfection protocols appeared difficult to set without any a priori such as the choice of the pathogen that will be inoculated first and the delay between infections. One possibility to deal with multiple parameters is to use intra-host infection mathematical modelling [143] allowing to play, at limited cost, with the different parameters of the coinfections. However, these models need to be fed with data coming from conventional in vitro experiments as well as more complex in vivo studies. The other possibility is to rely on field prevalence studies monitoring the very presence of the pathogens (isolation, PCR) instead of the sero-conversion, in order to have a clear epidemiological picture of when and where coinfections occur.

Consequently, ex vivo models such as PCLS generated from freshly sacrificed pigs [137] or organoids [138] are developing. These models are closer to mimic the in vivo situation than usual in vitro approaches, combining different types of cells and providing the pathogens with a wider range of cell hosts. However, the contribution of the immune response to the interaction between different pathogens is rarely considered [97]. Furthermore, the MOI cannot be controlled because the number of infected cells in the slice or the organoid cannot be monitored easily either.

Another limiting factor in coinfection studies is the cell regeneration, which can vary between in vivo and in vitro models. Cell regeneration can highly affect the dynamics of a coinfection, giving some pathogens extra target cells guarantying their longer existence while contributing to the clearance of others [140]. Finally, other potential technical limitations could always be discussed such as the lack of precision or sensitivity in the different diagnostic techniques especially in the presence of multiple agents. Hence, the detection of coinfecting pathogens could be compromised or reduced as compared to their detection level in the context of single infections.

4 Conclusion and perspectives

As shown in this review many works have been dedicated to the study of coinfections and superinfections in pigs. Usually, when the experiments were carried out in vivo, the researchers were more interested in the clinical outcome than in the interactions occurring between pathogens. Indeed, in most of the cases the

fine interactions between pathogens and especially the mechanisms behind these interactions and its potential consequences, at the molecular level, on the immune response were not studied for several reasons including technical limitations. Also, in the studies assessing the occurrence of coinfections/superinfections in the fields, coinfection identification based on molecular tools such as PCR would be more accurate than sero-prevalence approaches which are less prone to identify currently present pathogens and thus coinfective pathogens. Then, a better knowledge of each pathogen involved is crucial. We thus would like to make recommendations for future studies dealing with respiratory coinfections in pigs: (i) Authors should clearly summarize their coinfection or superinfection experimental setup—doses of pathogens, delays between infections—in their Materials and methods section; (ii) in this summary they would need to clearly present the pathogens they use and they should, as often as possible, select well-characterized strains; (iii) environmental and management conditions would need a strict control and monitoring; (iv) animal genetic and sanitary status would need to be carefully described and monitored during the study; and (v) the multiplications of all the pathogens shall be followed during the experiment using highly sensitive and specific assays. A clear description of all these parameters would help the scientific community to compare studies and progress in the understanding of the complex interactions between microorganisms.

In the last years, the concept of innate immune memory or trained immunity has gained a lot of interest. This concept is coming from old observation, in 1946 [144], recognizing that the bacterial vaccine strain “*Bacille de Calmette et Guérin*” (BCG) was protecting not only against *Mycobacterium tuberculosis* but also against antigenically different microorganism causing childhood mortality, suggesting an “adaptation” of the cellular innate immune system. Since then, many interesting studies about innate immune memory or trained immunity have been published (for a review see [145]) and it is recognized that cells such as myeloid cells, NK cells, and even epithelial cells [146] can have a higher and quicker response upon re-exposure to a pathogen. Trained immunity is accompanied by epigenetic changes and most often associated with modifications in cellular metabolism. A close look at potential epigenetic changes and cellular metabolism modifications would be of high interest in respiratory coinfection studies in the porcine species. Recently an alternative to the mechanism of trained immunity in resident lung innate immune cells named “epigenetic legacy” has been described [147]. In that study, the authors demonstrated that following IAV clearance and clinical recovery (1-month post-infection),

mice were better protected from *Streptococcus pneumoniae* infection by adult bone-marrow-derived AMs displaying transient transcriptional and epigenetic distinct profiles. This newly described consequence of a first viral infection also needs additional studies about PRDC with an identification of the mechanisms shaping the complex interactions between pathogens.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00807-8>.

Additional file 1. Studies about coinfections in the pig respiratory tract and their consequences.

Acknowledgements

The authors would like to thank the colleagues who shared their experience regarding coinfections in pigs. FM is supported by an establishment grant from the *Région Pays de la Loire* (RFI Food for tomorrow-Cap aliment). GS PhD is funded by Foundation Philippe Jabre (Liban).

Authors' contributions

All the authors were involved in the writing of the review. GS, NB, and FM generated the figures. GS, CD, JB, CF, CM-C, GSi, NB and FM prepared the Additional file 1. All the authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ INRAE, Oniris, BIOEPAR, 44300 Nantes, France. ² Swine Virology Immunology Unit, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, ANSES, BP 53, 22440 Ploufragan, France. ³ University of Rennes 1, Rennes, France. ⁴ Mycoplasma, Bacteriology and Antibiotics Resistance Unit, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, ANSES, BP 53, 22440 Ploufragan, France. ⁵ Epidemiology Health and Welfare Unit, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, ANSES, BP 53, 22440 Ploufragan, France. ⁶ Institute of Virology and Immunology (IVI), Sensemattstrasse 293, 3147 Mittelhäusern, Switzerland. ⁷ Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, QC, Canada. ⁸ College of Veterinary Medicine, Comparative Medicine Research Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China. ⁹ Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-Product Safety, Yangzhou 225009, China. ¹⁰ Department of Infectious Diseases and Pathobiology, University of Bern, 3012 Bern, Switzerland.

Received: 24 March 2020 Accepted: 2 June 2020

Published online: 16 June 2020

References

- Opriessnig T, Gimenez-Lirola LG, Halbur PG (2011) Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev* 12:133–148
- Kumar N, Sharma S, Barua S, Tripathi BN, Rouse BT (2018) Virological and immunological outcomes of coinfections. *Clin Microbiol Rev* 31:e00111–e00117
- Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL (2002) Porcine respiratory disease complex. In: Brogden KA, Guthmiller JM (eds) *Polymicrobial diseases*. ASM Press, Washington DC
- Asner SA, Science ME, Tran D, Smieja M, Merglen A, Mertz D (2014) Clinical disease severity of respiratory viral co-infection versus single viral infection: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 9:e99392
- Loosli CG (1968) Synergism between respiratory viruses and bacteria. *Yale J Biol Med* 40:522–540
- Morrison RB, Pijoan C, Hilley HD, Rapp V (1985) Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Can J Comp Med* 49:129–137
- Choi YK, Goyal SM, Joo HS (2003) Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J* 44:735–737
- Fablet C, Marois-Crehan C, Simon G, Grasland B, Jestin A, Kobisch M, Madec F, Rose N (2012) Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: a cross-sectional study. *Vet Microbiol* 157:152–163
- Liu X, Xu Z, Zhu L, Liao S, Guo W (2014) Transcriptome analysis of porcine thymus following porcine cytomegalovirus infection. *PLoS One* 9:e113921
- Thacker E, Thacker B, Janke B (2001) Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol* 39:2525–2530
- Kim K-S, Jung J-Y, Kim J-H, Kang S-C, Hwang E-K, Park B-K, Kim D-Y, Kim J-H (2011) Epidemiological characteristics of pulmonary pneumocystosis and concurrent infections in pigs in Jeju Island, Korea. *J Vet Sci* 12:15
- Fablet C, Marois C, Kuntz-Simon G, Rose N, Dorenlor V, Eono F, Eveno E, Jolly JP, Le Devendec L, Tocqueville V, Queguiner S, Gorin S, Kobisch M, Madec F (2011) Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Vet Microbiol* 147:329–339
- Fablet C, Marois C, Dorenlor V, Eono F, Eveno E, Jolly JP, Le Devendec L, Kobisch M, Madec F, Rose N (2012) Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Res Vet Sci* 93:627–630
- Kuhn JH, Lauck M, Bailey AL, Shchetinin AM, Vishnevskaya TV, Bao Y, Ng TFF, LeBreton M, Schneider BS, Gillis A, Tamoufe U, Diffio JLD, Takuo JM, Kondov NO, Coffey LL, Wolfe ND, Delwart E, Clawson AN, Postnikova E, Bollinger L, Lackemeyer MG, Radoshitzky SR, Palacios G, Wada J, Shevtsova ZV, Jahrling PB, Lapin BA, Deriabin PG, Dunowska M, Alkhovsky SV et al (2016) Reorganization and expansion of the nidoviral family *Arteriviridae*. *Arch Virol* 161:755–768
- Bordet E, Maisonnasse P, Renson P, Bouguyon E, Crisci E, Tiret M, Descamps D, Bernelin-Cottet C, Urien C, Lefèvre F, Jouneau L, Bourry O, Leplat J-J, Schwartz-Cornil I, Bertho N (2018) Porcine alveolar macrophage-like cells are pro-inflammatory pulmonary intravascular macrophages that produce large titers of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Sci Rep* 8:10172
- Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, Renukaradhya GJ (2016) Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci* 4:129–154
- Singleton H, Graham SP, Frossard J-P, Bodman-Smith KB, Steinbach F (2018) Infection of monocytes with European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) strain Lena is significantly enhanced by dexamethasone and IL-10. *Virology* 517:199–207
- Chang HH-C, Peng Y-T, Chang HH-C, Chaung H-C, Chung W-B (2008) Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 129:281–293
- 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. *Arch Virol* 152:289–303
- Bordet E, Blanc F, Tiret M, Crisci E, Bouguyon E, Renson P, Maisonnasse P, Bourge M, Leplat J-J, Giuffra E, Jouneau L, Schwartz-Cornil I, Bourry O, Bertho N (2018) 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. *Front Immunol* 9:2299
- Guilliams M, Ginhoux F, Jakubczik C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S (2014) Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14:571–578
- Zhang Q, Yoo D (2015) PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Vet Microbiol* 177:229–241
- Xie J, Christiaens I, Yang B, Van Breedam W, Cui T, Nauwynck HJ (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). *J Gen Virol* 98:2030–2042

24. Vanderheijden N, Delputte PL, Favoreel HW, Vandekerckhove J, Van Damme J, van Woensel PA, Nauwynck HJ (2003) Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol* 77:8207–8215
25. Whitworth KM, Rowland RRR, Ewen CL, Tribble BR, Kerrigan MA, Cino-Ozuna AG, Samuel MS, Lightner JE, McLaren DG, Mileham AJ, Wells KD, Prather RS (2016) Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat Biotechnol* 34:20–22
26. Wells KD, Bardot R, Whitworth KM, Tribble BR, Fang Y, Mileham A, Kerrigan MA, Samuel MS, Prather RS, Rowland RRR (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. *J Virol* 91:e01521-16
27. Hou G, Xue B, Li L, Nan Y, Zhang L, Li K, Zhao Q, Hiscoc JA, Stewart JP, Wu C, Wang J, Zhou E-M (2019) Direct interaction between CD163 N-terminal domain and MYH9 C-terminal domain contributes to porcine reproductive and respiratory syndrome virus internalization by permissive cells. *Front Microbiol* 10:1815
28. 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. *Res Vet Sci* 67:47–52
29. Thanawongnuwech R, Thacker B, Halbur P, Thacker EL (2004) Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:901–908
30. Lee S-M, Schommer SK, Kleiboeker SB (2004) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates differ in in vitro interferon phenotypes. *Vet Immunol Immunopathol* 102:217–231
31. Gimeno M, Darwich L, Diaz I, de la Torre E, Pujols J, Martín M, Inumaru S, Cano E, Domingo M, Montoya M, Mateu E (2011) Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet Res* 42:9
32. Wei R, Van Renne N, Nauwynck HJ (2019) Strain-dependent porcine circovirus type 2 (PCV2) entry and replication in T-lymphoblasts. *Viruses* 11:813
33. Nauwynck HJ, Sanchez R, Meerts P, Lefebvre DJ, Saha D, Huang L, Misinzo G (2012) Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. *Virus Res* 164:43–45
34. Segales J, Allan GM, Domingo M, Segalés J, Allan GM, Domingo M, Segales J, Allan GM, Domingo M (2005) Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 6:119–142
35. Sanchez RE, Meerts P, Nauwynck HJ, Ellis JA, Pensaert MB (2004) Characteristics of porcine circovirus-2 replication in lymphoid organs of pigs inoculated in late gestation or postnatally and possible relation to clinical and pathological outcome of infection. *J Vet Diagn Investig* 16:175–185
36. Yu S, Opriessnig T, Kitikoon P, Nilubol D, Halbur PG, Thacker E (2007) Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 115:261–272
37. Steiner E, Balmelli C, Herrmann B, Summerfield A, McCullough K (2008) Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology* 378:311–322
38. Vincent IE, Carrasco CP, Herrmann B, Meehan BM, Allan GM, Summerfield A, McCullough KC (2003) Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol* 77:13288–13300
39. Nielsen J, Vincent IE, Bøtner A, Ladekjær-Mikkelsen A-S, Allan G, Summerfield A, McCullough KC (2003) Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 92:97–111
40. Darwich L (2003) Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol* 84:3453–3457
41. Doster AR, Subramaniam S, Yhee J-Y, Kwon B-J, Yu C-H, Kwon S-Y, Osorio FA, Sur J-H (2010) Distribution and characterization of IL-10-secreting cells in lymphoid tissues of PCV2-infected pigs. *J Vet Sci* 11:177–183
42. Kekarainen T, Montoya M, Dominguez J, Mateu E, Segalés J (2008) Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses. *Vet Immunol Immunopathol* 124:41–49
43. Vincent IE, Carrasco CP, Guzylack-Piriou L, Herrmann B, McNeilly F, Allan GM, Summerfield A, McCullough KC (2005) Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* 115:388–398
44. Crisci E, Mussa T, Fraile L, Montoya M (2013) Review: influenza virus in pigs. *Mol Immunol* 55:200–211
45. Meischel T, Villalon-Letelier F, Saunders PM, Reading PC, Londrigan SL (2020) Influenza A virus interactions with macrophages: lessons from epithelial cells. *Cell Microbiol* 22:e13170
46. Summerfield A, McCullough KC (2009) Dendritic cells in innate and adaptive immune responses against influenza virus. *Viruses* 1:1022–1034
47. Chaimayo C, Dunagan M, Hayashi T, Santoso N, Takimoto T (2018) Specificity and functional interplay between influenza virus PA-X and NS1 shutoff activity. *PLoS Pathog* 14:e1007465
48. Park H, Liu G, Raman NT, Landreth SL (2018) NS1 Protein of 2009 pandemic influenza A virus inhibits porcine NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 beta production by suppressing ASC ubiquitination. *J Virol* 92:e00022-18
49. Vlasova AN, Wang Q, Jung K, Langel SN, Malik YS, Saif LJ (2020) Porcine coronaviruses. *Emerging transboundary animal viruses*. Springer, Singapore, pp 79–110
50. Zhou P, Fan H, Lan T, Yang X-L, Shi W-F, Zhang W, Zhu Y, Zhang Y-W, Xie Q-M, Mani S, Zheng X-S, Li B, Li J-M, Guo H, Pei G-Q, An X-P, Chen J-W, Zhou L, Mai K-J, Wu Z-X, Li D, Anderson DE, Zhang L-B, Li S-Y, Mi Z-Q, He T-T, Cong F, Guo P-J, Huang R, Luo Y et al (2018) Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature* 556:255–258
51. Chen W, Yan M, Yang L, Ding B, He B, Wang Y, Liu X, Liu C, Zhu H, You B, Huang S, Zhang J, Mu F, Xiang Z, Feng X, Wen J, Fang J, Yu J, Yang H, Wang J (2005) SARS-associated coronavirus transmitted from human to pig. *Emerg Infect Dis* 11:446–448
52. Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Huang B, Liu R, He X, Shuai L, Sun Z, Zhao Y, Liu P, Liang L, Cui P, Wang J, Zhang X, Guan Y, Tan W, Wu G, Chen H, Bu Z (2020) Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science* 368:1016–1020
53. Delmas B, Gelfi J, Sjöström H, Noren O, Laude H (1993) Further characterization of aminopeptidase-N as a receptor for coronaviruses. *Adv Exp Med Biol* 342:293–298
54. Mettenleiter T, Ehlers B, Müller T, Yoon K, Teifke J (2019) Herpesviruses. In: Zimmerman JJ, Krieger LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J (eds) *Diseases of swine*, 11th edn. Wiley, Chichester
55. Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ (2005) Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:462–500
56. Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH (2000) Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 275:1–8
57. Ober BT, Teufel B, Wiesmüller K-H, Jung G, Pfaff E, Saalmüller A, Rziha H-J (2000) The porcine humoral immune response against pseudorabies virus specifically targets attachment sites on glycoprotein gC. *J Virol* 74:1752–1760
58. Huang C, Hung J-J, Wu C-Y, Chien M-S (2004) Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses. *Vet Microbiol* 101:209–214
59. Sassu EL, Bossé JT, Tobias TJ, Gottschalk M, Langford PR, Hennig-Pauka I (2018) Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*-knowledge, gaps and challenges. *Transbound Emerg Dis* 65(Suppl 1):72–90
60. Gottschalk M, Broes A (2019) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Zimmerman JJ, Krieger LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J (eds) *Diseases of swine*, 11th edn. Wiley, Chichester
61. Kaplan JB, Mulks MH (2005) Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 108:89–94
62. van de Kerkhof A, Haesebrouck F, Chiers K, Ducatelle R, Kamp EM, Smits MA (1996) Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 64:3905–3907

63. Cullen JM, Rycroft AN (1994) Phagocytosis by pig alveolar macrophages of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 mutant strains defective in haemolysin II (ApxII) and pleurotoxin (ApxIII). *Microbiology* 140:237–244
64. Tarigan S, Slocombe RF, Browning GF, Kimpton W (1994) Functional and structural changes of porcine alveolar macrophages induced by sublytic doses of a heat-labile, hemolytic, cytotoxic substance produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Am J Vet Res* 55:1548–1557
65. Pieters MG, Maes D (2019) Mycoplasmosis. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J (eds) *Diseases of swine*, 11th edn. Wiley, Chichester
66. Maes D, Sibila M, Kuhnert P, Segales J, Haesebrouck F, Pieters M (2018) Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: knowledge gaps for improved disease control. *Transbound Emerg Dis* 65(Suppl 1):110–124
67. Adams C, Pitzer J, Minion FC (2005) *In Vivo* expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun* 73:7784–7787
68. Tacchi JL, Raymond BB, Haynes PA, Berry IJ, Widjaja M, Bogema DR, Woolley LK, Jenkins C, Minion FC, Padula MP, Djordjevic SP (2016) Post-translational processing targets functionally diverse proteins in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Open Biol* 6:150210
69. Dos Santos LF, Sreevatsan S, Torremorell M, Moreira MA, Sibila M, Pieters M (2015) Genotype distribution of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herds from different geographical regions. *Vet Microbiol* 175:374–381
70. Raymond BBA, Turnbull L, Jenkins C, Madhkoor R, Schleicher I, Uphoff CC, Whitchurch CB, Rohde M, Djordjevic SP (2018) *Mycoplasma hyopneumoniae* resides intracellularly within porcine epithelial cells. *Sci Rep* 8:17697
71. Rodriguez F, Ramirez GA, Sarradell J, Andrada M, Lorenzo H (2004) Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Pathol* 130:306–312
72. Lorenzo H, Quesada O, Assuncao P, Castro A, Rodriguez F (2006) Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* 109:199–207
73. Sarradell J, Andrada M, Ramirez AS, Fernández A, Gómez-Villamandos JC, Jover A, Lorenzo H, Herráez P, Rodríguez F (2003) A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Pathol* 40:395–404
74. Bin L, Luping D, Bing S, Zhengyu Y, Maojun L, Zhixin F, Yanna W, Haiyan W, Guoqing S, Kongwang H (2014) Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *PLoS One* 9:e101968
75. Thanawongnuwech R, Young TF, Thacker B, Thacker EL (2001) Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Vet Immunol Immunopathol* 79:115–127
76. Trueeb BS, Braun RO, Auray G, Kuhnert P, Summerfield A (2020) Differential innate immune responses induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* in various types of antigen presenting cells. *Vet Microbiol* 240:108541
77. Brockmeier SL, Register KB, Nicholson TL, Loving C (2019) Bordetellosis. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J (eds) *Diseases of Swine*, 11th edn. Wiley, Chichester
78. Ackermann MR, Register KB, Gentry-Weeks C, Gwaltney SM, Magyar T (1997) A porcine model for the evaluation of virulence of *Bordetella bronchiseptica*. *J Comp Pathol* 116:55–61
79. Nicholson TL, Brockmeier SL, Loving CL (2009) Contribution of *Bordetella bronchiseptica* filamentous hemagglutinin and pertactin to respiratory disease in swine. *Infect Immun* 77:2136–2146
80. Sun N, Sun P, Lv H, Sun Y, Guo J, Wang Z, Luo T, Wang S, Li H (2016) Matriline displayed antiviral activity in porcine alveolar macrophages co-infected by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Sci Rep* 6:24401
81. Ramamoorthy S, Opriessnig T, Pal N, Huang FF, Meng XJ (2011) Effect of an interferon-stimulated response element (ISRE) mutant of porcine circovirus type 2 (PCV2) on PCV2-induced pathological lesions in a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) co-infection model. *Vet Microbiol* 147:49–58
82. Rovira A, Balasch M, Segales J, Garcia L, Plana-Duran J, Rosell C, Ellerbrok H, Mankertz A, Domingo M (2002) Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* 76:3232–3239
83. Salines M, Barnaud E, Andraud M, Eono F, Renson P, Bourry O, Pavio N, Rose N (2015) Hepatitis E virus chronic infection of swine co-infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Res* 46:55
84. Kitikoon P, Vincent AL, Jones KR, Nilubol D, Yu S, Janke BH, Thacker BJ, Thacker EL (2009) Vaccine efficacy and immune response to swine influenza virus challenge in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the time of SIV vaccination. *Vet Microbiol* 139:235–244
85. Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M (1996) Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet Microbiol* 48:325–335
86. Krimmling T, Schwegmann-Weßels C (2017) Comparison of mono- and co-infection by swine influenza A viruses and porcine respiratory coronavirus in porcine precision-cut lung slices. *Res Vet Sci* 115:470–477
87. Dong VH, Tu P-Y, Tsai P-C, Lin Y-H, Chang H-L, Kuo T-Y, Chiou M-T, Lin C-N, Chung W-B (2015) Expression of Toll-like receptor signaling-related genes in pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Res Vet Sci* 101:180–186
88. Wei H, Lenz SD, Van Alstine WG, Stevenson GW, Langohr IM, Pogranichny RM (2010) Infection of cesarean-derived colostrum-deprived pigs with porcine circovirus type 2 and Swine influenza virus. *Comp Med* 60:45–50
89. Opriessnig T, Fenaux M, Yu S, Evans RB, Cavanaugh D, Gallup JM, Pallares FJ, Thacker EL, Lager KM, Meng XJ, Halbur PG (2004) Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfected with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. *Vet Microbiol* 98:209–220
90. Sibila M, Fort M, Nofrarías M, Pérez de Rozas A, Galindo-Cardiel I, Mateu E, Segalés J (2012) Simultaneous porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-inoculation does not potentiate disease in conventional pigs. *J Comp Pathol* 147:285–295
91. Yazawa S, Okada M, Ono M, Fujii S, Okuda Y, Shibata I, Kida H (2004) Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus (A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 98:221–228
92. Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker BJ (1999) *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* 37:620–627
93. Deblanc C, Robert F, Pinard T, Gorin S, Quéguiner S, Gautier-Bouchardon AV, Ferré S, Garraud JM, Cariolet R, Brack M, Simon G (2013) Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* induces oxidative stress that influences outcomes of a subsequent infection with a swine influenza virus of H1N1 subtype. *Vet Microbiol* 162:643–651
94. Almand EA, Moore MD, Jaykus L-A (2017) Virus-bacteria interactions: an emerging topic in human infection. *Viruses* 9:58
95. McCullers JA (2014) The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol* 12:252–262
96. Wang Y, Gagnon CA, Savard C, Music N, Srednik M, Segura M, Lachance C, Bellehumeur C, Gottschalk M (2013) Capsular sialic acid of *Streptococcus suis* serotype 2 binds to swine influenza virus and enhances bacterial interactions with virus-infected tracheal epithelial cells. *Infect Immun* 81:4498–4508
97. Meng F, Wu NH, Nerlich A, Herrler G, Valentin-Weigand P, Seitz M (2015) Dynamic virus-bacterium interactions in a porcine precision-cut lung slice coinfection model: swine influenza virus paves the way for *Streptococcus suis* infection in a two-step process. *Infect Immun* 83:2806–2815
98. Lin X, Huang C, Shi J, Wang R, Sun X, Liu X, Zhao L, Jin M (2015) Investigation of pathogenesis of H1N1 influenza virus and swine *Streptococcus suis* serotype 2 co-infection in pigs by microarray analysis. *PLoS One* 10:e0124086
99. Dang Y, Lachance C, Wang Y, Gagnon CA, Savard C, Segura M, Grenier D, Gottschalk M (2014) Transcriptional approach to study porcine tracheal

- epithelial cells individually or dually infected with swine influenza virus and *Streptococcus suis*. *BMC Vet Res* 10:86
100. Deblanc C, Delgado-Ortega M, Gorin S, Berri M, Paboef F, Berthon P, Herrler G, Meurens F, Simon G (2016) *Mycoplasma hyopneumoniae* does not affect the interferon-related anti-viral response but predisposes the pig to a higher level of inflammation following swine influenza virus infection. *J Gen Virol* 97:2501–2515
 101. Zhang H, Lunney JK, Baker RB, Opiressnig T (2011) Cytokine and chemokine mRNA expression profiles in tracheobronchial lymph nodes from pigs singularly infected or coinfecting with porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHYO). *Vet Immunol Immunopathol* 140:152–158
 102. Cho JG, Dee SA, Deen J, Trincado C, Fano E, Jiang Y, Faaberg K, Murtaugh MP, Guedes A, Collins JE, Joo HS (2006) The impact of animal age, bacterial coinfection, and isolate pathogenicity on the shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols from experimentally infected pigs. *Can J Vet Res* 70:297–301
 103. Levesque C, Provost C, Labrie J, Hernandez Reyes Y, Burciaga Nava JA, Gagnon CA, Jacques M, Lévesque C, Provost C, Labrie J, Hernandez Reyes Y, Burciaga Nava JA, Gagnon CA, Jacques M, Levesque C, Provost C, Labrie J, Hernandez Reyes Y, Burciaga Nava JA, Gagnon CA, Jacques M (2014) *Actinobacillus pleuropneumoniae* possesses an antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One* 9:e98434
 104. van Dixhoorn IDE, Reimert I, Middelkoop J, Bolhuis JE, Wisselink HJ, Groot Koerkamp PWG, Kemp B, Stockhofe-Zurwieden N (2016) Enriched housing reduces disease susceptibility to co-infection with porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) in young pigs. *PLoS One* 11:e0161832
 105. Pol JM, van Leengoed LA, Stockhofe N, Kok G, Wensvoort G (1997) Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Vet Microbiol* 55:259–264
 106. Short FL, Murdoch SL, Ryan RP (2014) Polybacterial human disease: the ills of social networking. *Trends Microbiol* 22:508–516
 107. Eisenreich W, Rudel T, Heesemann J, Goebel W (2019) How viral and intracellular bacterial pathogens reprogram the metabolism of host cells to allow their intracellular replication. *Front Cell Infect Microbiol* 9:42
 108. Fourour S, Marois-Créhan C, Martelet L, Fablet C, Kempf I, Gottschalk M, Segura M (2019) Intra-species and inter-species differences in cytokine production by porcine antigen-presenting cells stimulated by *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, and *M. flocculare*. *Pathogens* 8:34
 109. Dianzani F (1975) Viral interference and interferon. *Ric Clin Lab* 5:196–213
 110. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A (2015) Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15:87–103
 111. Zhou J-H, Wang Y-N, Chang Q-Y, Ma P, Hu Y, Cao X (2018) Type III interferons in viral infection and antiviral immunity. *Cell Physiol Biochem* 51:173–185
 112. Boxx GM, Cheng G (2016) The roles of type I interferon in bacterial infection. *Cell Host Microbe* 19:760–769
 113. Doughty L, Nguyen K, Durbin J, Biron C (2001) A role for IFN-alpha beta in virus infection-induced sensitization to endotoxin. *J Immunol* 166:2658–2664
 114. Shirey KA, Perkins DJ, Lai W, Zhang W, Fernando LR, Gusovsky F, Blanco JCG, Vogel SN (2019) Influenza "trains" the host for enhanced susceptibility to secondary bacterial infection. *mBio* 10:e00810-19
 115. Li W, Moltedo B, Moran TM (2012) Type I interferon induction during influenza virus infection increases susceptibility to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection by negative regulation of $\gamma\delta$ T cells. *J Virol* 86:12304–12312
 116. Marcus PI (1977) Intrinsic interference: non-interferon mediated viral interference. *Tex Rep Biol Med* 35:336–342
 117. Moore MD, Jaykus L-A (2018) Virus-bacteria interactions: implications and potential for the applied and agricultural sciences. *Viruses* 10:61
 118. Yang Y, Lyu T, Zhou R, He X, Ye K, Xie Q, Zhu L, Chen T, Shen C, Wu Q, Zhang B, Zhao W (2019) The antiviral and antitumor effects of defective interfering particles/genomes and their mechanisms. *Front Microbiol* 10:1852
 119. Tan FL, Yin JQ (2004) RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. *Cell Res* 14:460–466
 120. Flenniken ML, Andino R (2013) Non-specific dsRNA-mediated antiviral response in the honey bee. *PLoS One* 8:e77263
 121. Lemm JA, Rice CM (1993) Roles of nonstructural polyproteins and cleavage products in regulating Sindbis virus RNA replication and transcription. *J Virol* 67:1916–1926
 122. Meurens F, Schynts F, Keil GMM, Muylkens B, Vanderplasschen A, Gallego P, Thiry E (2004) Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *J Virol* 78:3872–3879
 123. Muñoz-González S, Pérez-Simó M, Colom-Cadena A, Cabezón O, Bohórquez JA, Rosell R, Pérez LJ, Marco I, Lavín S, Domingo M, Ganges L (2016) Classical swine fever virus vs. classical swine fever virus: the superinfection exclusion phenomenon in experimentally infected wild boar. *PLoS One* 11:e0149469
 124. Sinha A, Shen HG, Schalk S, Beach NM, Huang YW, Meng XJ, Halbur PG, Opiressnig T (2011) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) influences infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) subtypes PCV2a and PCV2b by prolonging PCV2 viremia and shedding. *Vet Microbiol* 152:235–246
 125. Niederwerder MC, Jaing CJ, Thissen JB, Cino-Ozuna AG, McLoughlin KS, Rowland RRR (2016) Microbiome associations in pigs with the best and worst clinical outcomes following co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Microbiol* 188:1–11
 126. Fan P, Wei Y, Guo L, Wu H, Huang L, Liu J, Liu C (2013) Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Virol J* 10:265
 127. Bentley K, Evans DJ (2018) Mechanisms and consequences of positive-strand RNA virus recombination. *J Gen Virol* 99:1345–1356
 128. Thiry E, Muylkens B, Meurens F, Gogev S, Thiry J, Vanderplasschen A, Schynts F (2006) Recombination in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *Vet Microbiol* 113:171–177
 129. Tashiro M, Ciborowski P, Klenk HD, Pulverer G, Rott R (1987) Role of *Staphylococcus protease* in the development of influenza pneumonia. *Nature* 325:536–537
 130. Qi W, Zhu R, Bao C, Xiao J, Liu B, Sun M, Feng X, Gu J, Li Y, Lei L (2019) Porcine circovirus type 2 promotes *Actinobacillus pleuropneumoniae* survival during coinfection of porcine alveolar macrophages by inhibiting ROS production. *Vet Microbiol* 233:93–101
 131. Wu N-H, Valentin-Weigand P, Meng F, Herrler G, Seitz M (2015) Sialic acid-dependent interactions between influenza viruses and *Streptococcus suis* affect the infection of porcine tracheal cells. *J Gen Virol* 96:2557–2568
 132. Passariello C, Nencioni L, Sgarbanti R, Ranieri D, Torrisi MR, Ripa S, Garaci E, Palamara AT (2011) Viral hemagglutinin is involved in promoting the internalisation of *Staphylococcus aureus* into human pneumocytes during influenza A H1N1 virus infection. *Int J Med Microbiol* 301:97–104
 133. Botić T, Klingberg TD, Weingartl H, Cencic A (2007) A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *Int J Food Microbiol* 115:227–234
 134. Belon C, Blanc-Potard A-B (2016) Intramacrophage survival for extracellular bacterial pathogens: MgtC as a key adaptive factor. *Front Cell Infect Microbiol* 6:52
 135. Niederwerder MC (2017) Role of the microbiome in swine respiratory disease. *Vet Microbiol* 209:97–106
 136. Lijek RS, Weiser JN (2012) Co-infection subverts mucosal immunity in the upper respiratory tract. *Curr Opin Immunol* 24:417–423
 137. Delgado-Ortega M, Melo S, Punyadarsaniya D, Ramé C, Olivier M, Soubieux D, Marc D, Simon G, Herrler G, Berri M, Dupont J, Meurens F (2014) Innate immune response to a H3N2 subtype swine influenza virus in newborn porcine trachea cells, alveolar macrophages, and precision-cut lung slices. *Vet Res* 45:42
 138. Bar-Ephraim YE, Kretzschmar K, Clevers H (2019) Organoids in immunological research. *Nat Rev Immunol* 20:279–293
 139. Meurens F, Keil GM, Muylkens B, Gogev S, Schynts F, Negro S, Wiggers L, Thiry E (2004) Interspecific recombination between two ruminant alphaherpesviruses, bovine herpesviruses 1 and 5. *J Virol* 78:9828–9836
 140. Pinky L, Dobrovolny HM (2016) Coinfections of the respiratory tract: viral competition for resources. *PLoS One* 11:e0155589

141. Wiegand SB, Jaroszewicz J, Potthoff A, Höner Zu Siederdisen C, Maassoumy B, Deterding K, Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M (2015) Dominance of hepatitis C virus (HCV) is associated with lower quantitative hepatitis B surface antigen and higher serum interferon- γ -induced protein 10 levels in HBV/HCV-coinfected patients. *Clin Microbiol Infect* 21:710.e1–710.e9
142. Provost C, Hamonic G, Gagnon CA, Meurens F (2017) Dual infections of CD163 expressing NPTr epithelial cells with influenza A virus and PRRSV. *Vet Microbiol* 207:143–148
143. Go N, Belloc C, Bidot C, Touzeau S (2019) Why, when and how should exposure be considered at the within-host scale? A modelling contribution to PRRSV infection. *Math Med Biol* 36:179–206
144. Levine MI, Sackett MF (1946) Results of BCG immunization in New York City. *Am Rev Tuberc* 53:517–532
145. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LAJ, Xavier RJ (2016) Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science* 352:aaf1098
146. Hamada A, Torre C, Drancourt M, Ghigo E (2018) Trained immunity carried by non-immune cells. *Front Microbiol* 9:3225
147. Aegerter H, Kulikauskaite J, Crotta S, Patel H, Kelly G, Hessel EM, Mack M, Beinke S, Wack A (2020) Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection. *Nat Immunol* 21:145–157

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Additional file 1A: Description of experimental assays carried out to study viral/viral coinfections and superinfections involved in PRDC (in vitro + ex vivo)

Coinfections	Protocols	Selected cells or tissues	Identified target cells	Viral interference	Immune responses	Reference PMIDs
swIAV PRRSV	swIAV: H1N1 Sw/Saskatchewan/18 789/02 PRRSV: ISU-12- SAH Interv: 3h/Inf: 15h +18h	NPTr- CD163	NPTr-CD163	- PRRSV reduced the replication of swIAV in coinfection and when inoculated 3h after. - swIAV decreased replication of PRRSV when inoculated 3h before.	- Both RNA viruses interfere with each other. - PRRSV primary infection has less effect than swIAV primary infection. - No clear synergistic nor additive effects observed - IFN λ 1 are more expressed than other IFN.	28757015
	swIAV: H1N1 Sw/Saskatchewan/18 789/02 PRRSV: ISU-12- SAH Interv: 3h/Inf: 18h	Lung slices AM	swIAV: Epithelial cells PRRSV: Pneumocytes type 1/M Φ No coinfecting cells	- PRRSV replication suppressed by swIAV - PRRSV did not alter swIAV replication in PCLS but reduced its replication in AMs.	- PRRSV reduced the response to swIAV. - swIAV showed low impact on PRRSV infection. - swIAV alters the ISGs expression but not PRRSV. - PCLS, synergy for TLR3, RIGI, and IFN β expressions	24418046
swIAV PRCoV	swIAV: H1N1 A/sw/Bad Griesbach/IDT5604/2 006 and H3N2 A/sw/Bissendorf/IDT 1864/2003 PRCoV: Bel85 Interv: 0h/Inf: 72h	NPTr Lung slices	NPTr more permissive to swIAV than to PRCoV	- Viral titers in coinfections were lower than in single-infections.	- swIAV single- and coinfections with PRCoV showed stronger effects on ciliary activity than PRCoV single-infections.	28779714
PCV2 PRRSV	PCV2: Local field strain PRRSV: JS-1 Interv: 2h/Inf: 6h to 96h	AM	AM permissive to both viruses	- PRRSV and PCV2 replication enhanced	- The coinfection induced I κ B α degradation and phosphorylation \rightarrow induced NF- κ B activation.	27080155
	PRRSV: VR2385 PCV2b: NC-16845 Interv: 0d/Inf: 24h	MoDC	MoDC	- ND	- DCs develop a regulatory phenotype upon PCV2 + PRRSV coinfection. - IL10 production increased in coinfection. - CD86 decreased in coinfection. - PDL1 increased in co- and PCV2 single-infection.	26446939
	PRRSV: VR2385 PCV2a: ISU-40895 Interv: 0h/Inf: 36h	DC	DC	- ND	- DC permissive to PCV2 + PRRSV - PRRSV coinfection increased Treg lymphocytes. - TGF β is upregulated in coinfection condition.	22633482

	PRRSV: tw91 PCV2: Local strain Interv: 0h/Inf: 18, 36, 54, 72, 90, 108h	AM	AM permissive to both viruses	- PRRSV infection rate was reduced in the presence of PCV2. However, the infectivity of PCV2 was unaffected.	- Cell death and apoptosis were reduced in coinfection conditions compared to PRRSV single infected AMs. - The reduction of PRRSV infection by PCV2 is related to the increased production of IFN α .	15936905
PCV2 CSFV	PCV2: HZ0201 CSFV: HCLV Interv: 0/Inf: 72h	PK15 ST AM	- PK15 and ST permissive to both viruses - AM permissive to PCV2 and not to CSFV	- PCV2 not influenced by CSFV - PCV2 suppressed CSFV.	- No effect of coinfection on apoptosis	26431319

swIAV: swine Influenza A Virus, PRRSV: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PCV2: Porcine Circovirus type 2 (subspecies a and b when indicated), CSFV: Classical Swine Fever Virus, PRCoV: Porcine Respiratory Coronavirus, AM: Alveolar Macrophage, NPTr: Newborn Pig Trachea cell line, DC: Dendritic Cells, MoDC: Monocyte Derived Dendritic Cells, PK15: Pig Kidney cells 15, ST: Swine Testicle cells, Interv: Interval, Inf: Duration of the infection assay

Additional file 1B Description of experimental assays carried to study viral/viral coinfections and superinfections involved in PRDC (in vivo)

Coinfections	Protocols	Clinical signs	Macroscopic lesions	Microscopic lesions	Other observations	Reference PMIDs
PRRSV swIAV	PRRSV: 10PL01 swIAV: H1N1 A/Swine/Thailand/CU-PL65/2010 PRRSV then swIAV Interv: 6 days	No major differences in clinical signs were registered except a prolonged fever in coinfecting pigs compared to single-infected ones.	Coinfecting group showed higher lung lesion scores than PRRSV single-infected group.	Interstitial pneumonia was more severe following infection with PRRSV. Additionally, coinfecting animals showed epithelial necrosis and mononuclear cells infiltration in the alveolar septum.	-H1N1 viral load was more important in coinfecting group compared to single-infected.	(no PMID) The Thai Journal of Veterinary Medicine, 49(1), 71-79
	PRRSV: VR2385 swIAV: H1N1 A/Swine/IA/40776/92 PRRSV: at 4 and 7 wks of age swIAV: at 7 wks of age	-Fever and reduced weight gain in coinfecting animals -Coinfecting animals had the worst clinical disease.	Coinfecting pigs showed a high percentage of swIAV-induced pneumonia.	Coinfection induced important interstitial pneumonia.	-No increase in swIAV shedding -Increased lymphocyte proliferation after PRRSV infection -PRRSV infection reduced swIAV vaccine efficacy.	19595522
	PRRSV: Lelystad swIAV: H1N1 A/Sw/Belgium/1/83 PRRSV then swIAV Interv: 3, 7, and 14 days	-Differences in the clinical signs between coinfections and single infections were negligible. However, weight gain tends to be less important in coinfecting animals.	ND	ND	-The time interval between both infections can affect the clinical outcome. Multiple infections with an interval of 3 or 7 days resulted in an acute disease while an interval of 14 days between the viruses resulted in a subclinical infection. -Differences between coinfecting and single infected pigs were negligible.	15129583
	PRRSV: Lelystad swIAV: H3N2 PRRSV then swIAV Interv: 1 wk	ND	Coinfecting pigs showed larger bronchiolar and lung lymph nodes than single infected.	Coinfection induced more pronounced inflammation of the bronchiolar wall.	PRRSV infection had no effect on swIAV infection.	9220621
	PRRSV: Lelystad swIAV: H1N1 A/Sw/Belg/1/83 PRRSV then swIAV Interv: 3 days	More severe clinical signs in coinfecting animals than others	ND	ND	swIAV excretion delayed by PRRSV infection (2 days)	9054128

	PRRSV: PL15-33 swIAV: H1N1 A/Poland/Swine/14131/2014 Simultaneous infections	Most severe clinical signs in the coinfecting pigs	ND	ND	-The mean PRRSV load in BALF was higher in PRRSV-infected pigs than in coinfecting pigs. -IL6 and IL10 transcripts were upregulated in their expression in coinfecting pigs but not in PRRSV-infected animals.	31934657
PRRSV ADV	PRRSV: EDRD-1 strain ADV: YS-81 strain PRRSV then ADV interv: 14 days	More severe clinical signs in coinfecting pigs	Macroscopic lesions like brain congestion, pneumonia and thymus atrophy were more important in coinfecting pigs.	Coinfecting pigs showed more pronounced microscopic lesions (encephalitis, pneumonitis, tonsillitis and lymphadenitis).	ADV replication is enhanced by PRRSV.	16423576
	PRRSV: EDRD-1 strain ADV: YS-81 strain PRRSV then ADV interv: 14 days	Clinical signs were more severe in the coinfecting group.	Coinfecting pigs showed higher macroscopic lesions such as thymic atrophy, brain congestion and diffused pneumonia.	Neuronal microscopic lesions were more important in coinfecting pigs.	Shedding of both viruses was enhanced in coinfecting group.	15511536
	PRRSV: E4 strain ADV: Yamagata-S81 strain PRRSV then ADV Interv: 7 days	Prolonged febrile response in coinfecting pigs	Coinfecting pigs showed mottled or diffusely tan and red lungs with failure to collapse.	More severe pneumonic lesions in coinfecting group	PRRSV excretion was higher with coinfection conditions.	12710495
	PRRSV: Lelystad virus ter huurne ADV vaccine: strain M141 ADV: wild-type NIA-3 PRRSV then ADV vaccine then ADV challenge interv: 2 weeks then 8 weeks simultaneously	PRRSV pre-infected pigs only showed fever following ADV vaccination.	ND	Lymphoproliferative response to ADV was delayed and reduced but not inhibited in coinfecting pigs.	Inhibition of ADV viral shedding by vaccination not affected by PRRSV	10973691
PRRSV PRCoV	PRRSV: Lelystad PRCoV: 91V44 PRRSV then PRCoV Interv: 3 days	More severe clinical signs in coinfecting animals than others	ND	ND	PRCoV excretion not affected by PRRSV	9054128
	PRRSV: SD23983 PRCoV: ISU-1 PRRSV then PRCoV Interv: 10 days	Clinical signs were more severe in coinfecting animals.	ND	ND	Coinfecting pigs showed: -Synergistic decrease in NK-cytotoxicity. -Higher production of IL6, IL10 and TGF- β than other pigs. -Increased myeloid cells and CD4+CD8+ lymphocytes.	20883160
PRRSV TTSuV1	TTSuV1 natural infection + PRRSV vaccination	Prior infection with TTSuV1 increases	Macroscopic lung lesions more severe in	ND	TTSuV1 suppresses immunization by PRRSV	22327391

	+ PRRSV challenge Interv: 4 wks	PRRSV clinical signs.	case of TTSuV1 natural infection		vaccines and exacerbates PRRSV clinical signs.	
PCV2 swIAV	PCV2: ADDLPP 10069 swIAV: H1N1 PCV2 then swIAV Interv: 7 days	Higher clinical scores in coinfecting animals for a longer time	ND	No difference between coinfecting and single-infected groups	-swIAV did not affect the replication of PCV2. -No difference in the antibody titer to PCV2 in the presence of swIAV	20158948
PRRSV PCV2	PRRSV: HF6-7 PCV2: THF601-7 Simultaneous infections	More severe clinical signs in coinfecting pigs	More severe lesions in coinfecting pigs	More severe lesions in coinfecting pigs	-Positive synergistic effect on the CD14 mRNA expression in coinfection condition	26022073
	PRRSV: KS62 PCV2b: isolate 06-06274 Simultaneous infections	Coinfecting pigs were divided into worst and best clinical outcome groups. The best outcome group consisted of pigs without any clinical disease.	The worst clinical outcome coinfecting pigs showed interstitial pneumonia, granulomatous nephritis, multifocal fibrous adhesions in the abdomen and between the lungs.	In the worst clinical outcome groups, coinfection induced an interstitial pneumonia and a lymphoid depletion.	-PRRSV/PCV2 coinfection increased the rate of <i>Bacillus cereus</i> in the serum. -PRRSV and PCV2 replication was higher in the worst outcome group. -The microbial diversity was lower in the worst clinical group.	27139023
	PRRSV: MLV vaccine PRRSV: KS62 PCV2b: isolate 06-06274 Vaccination then simultaneous infections	Coinfection clinical signs were first reduced but increased later.	ND	After 22 days, PCV2 infection induced depletion of lymphocytes.	PRRSV vaccination decreased PRRSV viremia but increased PCV2 viremia.	26446422
	4 PCV2 vaccines PCV2b: SNUVR000463 PRRSV: SNUVR090851 Simultaneous infections post-vaccination	Coinfecting group showed tachypnea, abdominal breathing, and severe dyspnea. No clinical signs in all vaccinated groups	Vaccinated groups showed less pulmonary lesions than coinfecting non vaccinated group.	ND	-Coinfection prolonged severe clinical respiratory signs similarly to field PRDC. -The vaccination against PCV2 was efficient in PCV2/PRRSV coinfecting pigs.	24403524
	PRRSV: HBR PCV2b: YJ PRRSV then PCV2b and PCV2b then PRRSV Simultaneously or 7 days of delay	PRRSV/PCV2 group showed higher clinical scores than PCV2/PRRSV group.	PRRSV/PCV2 group showed the most severe haemorrhages. Dead pigs showed swollen, brown kidneys, and pulmonary congestion.	PRRSV/PCV2 group showed the most severe histological lesions.	-PRRSV/PCV2 group showed the highest viral loads and to the lowest antibody titers.	23971711
	PRRSV: VR2385 and NC16845b PCV2: 40895 and NC16845 Simultaneous infections	Coinfection induced more fever.	More severe macroscopic lung lesions for coinfecting groups than others.	Increased levels of lymphocytes in coinfecting pigs	-More severe lung lesions in coinfecting pigs than others -Stronger anti-PRRSV IgG response in response to coinfection	22406346
	PRRSV: VR2385 PCV2: 4089 Simultaneous infections	No differences between groups	Coinfection induced higher severe lung lesions than PRRSV single infection.	Microscopic lesions were more severe in PCV2/PRRSV than single infection group.	/	20637549

	PRRSV: VR2385 PCV2a: 40895 PCV2b: NC16845 Simultaneous infections	Coinfected pigs showed mild respiratory signs	Some coinfecting pigs showed lymphohistiocytic interstitial nephritis.	Mild lung lesions in coinfecting pigs	-PRRSV prolonged the infection with PCV2 and increased its replication. -No differences between the two PCV2 subtypes	21641124
	PCV vaccines PCV2: 40895 PRRSV: ISU12 Simultaneous challenges	No difference in clinical signs between coinfecting group and PRRSV single infected	Coinfecting group showed the highest lung lesions. Vaccination reduced these lesions in coinfecting pigs.	The highest scores of microscopic lesions in the coinfecting group animals.	-PCV2 single-infected pigs showed higher levels of Anti-PCV2-IgM than coinfecting group.	18430525
	PRRSV: HB-2 (sh)/2002 PCV2: BJ-HB Simultaneous infections	Clinical signs in the coinfection group were more pronounced.	Gross lesions were more severe in coinfection group.	ND	-Coinfection prolonged the disease, increased the replication of both viruses, and decreased the antibodies production and the number of WBCs.	18164875
	PRRSV: Olot/91 PCV2: / PRRSV then PCV2 7 days of delay	Coinfecting pigs suffered from growth retardation and fever.	ND	Coinfection has aggravated the lymphocyte depletion and the histiocytic infiltration.	-PRRSV increased the replication and the propagation of PCV2 in the lymphoid tissue and in the blood.	18164875
	PRRSV: NADC-20 PCV2: 35358 Simultaneous infections	Coinfection mortality rate of 100% on day 20 compared to 26% for PCV2 and 0% for PRRSV alone	Coinfecting pigs showed more pronounced hepatic lesions and severe proliferative interstitial pneumonia.	Microscopic lesions in coinfecting pigs were also present in PCV2 single-infected pigs.	-ND	11572560
PCV2 ADV	ADV: YN1 strain PCV2: ND Simultaneous infections	Coinfection increased clinical signs severity and mortality rate.	Higher neurologic and respiratory macroscopic lesions in the coinfecting group	Microscopic lesions were more severe in coinfecting pigs.	PCV2 increased ADV shedding in lungs and brain.	31585642
PCV2 PPV	PCV2: ISU-40895 PPV: NADL-8 2 PPV vaccinations before coinfection Simultaneous infections	Coinfecting animals had more pronounced fever.	Some coinfecting pigs showed icterus, bleeding gastric ulcers, and pneumonia.	Lymphoid depletion was more important in coinfection conditions.	-Vaccination for PPV enhanced the replication of PCV2 in coinfecting pigs. -Vaccination against PPV did not affect the severity of PCV2 clinical signs.	15036529
HEV PRRSV	HEV: Genotype 3 PRRSV: Finistère Half of the animals inoculated / half infected by contacts Simultaneous infections	ND	Coinfection caused dramatic increase in HEV lesions at slaughter time	ND	-PRRSV increased HEV shedding. -Immune response delayed -PRRSV increased HEV transmission and infection susceptibility. -Coinfection leads to chronic HEV infection.	26048774
PorPV swIAV	H1N1: H1N1 A/Swine/New Jersey/11/76	Coinfecting pigs showed increased	No macroscopic lesions were registered.	All groups presented interstitial pneumonia hyperplasia of the	-Both viruses infect the bronchiolar epithelium.	26854342

PorPV: PAC-3
PorPV then H1N1
Interv: 44 days

clinical signs.

bronchiolar lymphoid tissue.

-PorPV enhances the spread of
H1N1 in the respiratory tissues
without affecting the shedding.

swIAV: swine Influenza A Virus, PRRSV: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PCV2: Porcine Circovirus type 2 (subspecies a and b when indicated), CSFV: Classical Swine Fever Virus, PRCoV: Porcine Respiratory Coronavirus, TTsuV1: Torque Teno sus Virus 1, HEV: Hepatitis E Virus, PPV: Porcine Parvovirus, PorPV: Porcine Rubulavirus, WBCs: White Blood Cells, PRDC: Porcine Respiratory Disease Complex

Additional file 1C: Description of experimental assays carried to study bacterial/viral coinfections and superinfections involved in PRDC (in vitro + ex vivo)

Bacterium	Virus	Conditions	Cell types	Target cells	Replication/multiplication	Immune responses	Reference PMIDs
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	PRRSV	HP-PRRSV: NJGC Mhp: XLW-1 PRRSV then Mhp Interv: 1h, Duration: 6h, 15h	AM	AM	ND	-Several pathways are induced in coinfecting cells.	25445346
		PRRSV: VR2385 Mhp: 91-3 Duration: 24 and 48h	AM	ND	Mhp decreased the replication of PRRSV in AM at 24h.	-Increased production of IL1 β , IL8 and IL10 in coinfection conditions	11356254
	PCV2	PCV2: 2010AHCY Mhp: WX, AH, NJ, TH, XLW-1, and 168 PCV2 then Mhp, reverse, and simultaneous infections Interval: 0h to 24h, Duration: 72h	PK15	Both pathogens detected in the same cell	PCV2 replication was enhanced by subsequent inoculation with Mhp but not by prior or simultaneous co-inoculations.	-ND	27033909
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	PRRSV	PRRSV: IAF-Klop App: S4074 serotype 1 PRRSV then App Interv: 4h, Duration: 48h	MARC-145 SJPL AM	3 cell types permissive to PRRSV	PRRSV infection of SJPL and AM blocked by a pre-infection with App	-Enhanced cytotoxicity with coinfection -Anti-PRRSV activity due to App metabolites -IFN γ contributed to this antiviral activity.	24878741
		PRRSV: IAF-Klop App: MBHPP147 from S4074 PRRSV then App culture supernatant App culture supernatant for 2 hours then PRRSV then App culture supernatant Interv: 4h, Duration: 48h	MARC-145 SJPL AM	3 cell types permissive to PRRSV	Pre-treatment of AM with App culture supernatant reduced PRRSV replication in AM and SJPL but not in MARC-145 cells.	-The treatment of AM with App culture supernatant before the PRRSV infection decreased mRNA expression of IFN α and IFN β .	29293082
	PCV2	PCV2: CC1 App: L20 PCV2 then App or App then PCV2 or simultaneous Interv: 0h or 2h, Duration: 2h and 4h	AM	AM are infected by PCV2 and App.	App invasion and adhesion to AM was enhanced by PCV2.	-Clearance of App was reduced in coinfection conditions. -Reduction of TNF α , IL4, and IFN γ production in coinfection conditions	31176418
<i>Glaesserella parasuis</i>	swIAV	swIAV: H3N2 A/swine/Spain/SF32071/2007 Hp: SW114 (serovar 3) or Nagasaki (serovar 5) strains swIAV then Hp or Hp alone Interv: 1h, Duration: 1 or 8h	BMDC	-BMDC internalises Hp and swIAV. -Hp and swIAV in the same phagolysosome	ND	-No clear impact of swIAV pre-infection	23157617

PRRSV	PRRSV: Lelystad- CAPM V-490 Hp: HP 132 - CAPM 6475 PRRSV then Hp Interv: 24h, Duration: 28h and 48h	AM	AM	ND	-Increased IL1 β , IL8, and TNF α production in coinfection situation -Coinfection decreased ROS production.	26358898
	PRRSV: Lelystad - CAPM V-490 Hp: HP 132 - CAPM 6475 PRRSV then Hp Interv: 24h, Duration: 28h and 48h	AM MDM	MDMs are more sensitive to PRRSV than AM.	Replication of PRRSV not affected by Hp but coinfection reduced the growth of Hp.	-Coinfected macrophages produced less ROS than PRRSV single-infected cells.	28472979
	PRRSV: Lelystad Hp: HP 132 - CAPM 6475 PRRSV then Hp Interv: 24h, Duration: 28h and 48h	AM MDM	MDMs and AMs are permissive to PRRSV.	MDMs mortality is not affected by Hp in coinfection conditions.	-Coinfection of MDMs: Reduced gene expression and production of IL1 β and IL8 compared to single infections Reduced mRNA expression of CD86, CD14, and CXCL10 compared to Hp single infection Increased mRNA levels of TNF α -Unlike AMs, MDMs increased expression of IFN α following PRRSV infection.	30322536
<i>Streptococcus suis</i>	swIAV					
	swIAV: H1N1 A/swine/St-Hyacinthe/148/1990 Ss: 31533 swIAV then Ss Interv: 12h, Duration: 12h	NPT r	ND	ND	-CCL5, IL8, VCAM1, and COX2 significantly more upregulated in the presence of both pathogens compared to single-infection	24708855
	swIAV: H1N1 A/sw/Bad Griesbach/IDT5604/2006 and H3N2 A/sw/Herford/IDT5932/2007 Ss: 10 swIAV + Ss or Ss alone Interv: 0h, Duration: 72h	Lung slice	Ss selectively attached to swIAV-infected cells.	-swIAV promoted bacterial adherence and colonization. -Bacterial adherence facilitated by swIAV -swIAV-impairment of the mucociliary barrier plays a major role in promotion of bacterial infection.	ND	25916988
	swIAV: H3N2 A/swine/St-Hyacinthe/148/1990 Ss: 31533 swIAV then Ss Interv: 12h, Duration: 24h	NPT r	Colocalization of Ss and swIAV	Bacterial adhesion and invasion significantly increased by swIAV	-Higher levels of CCL2, CCL4, IL6, IL8, and TNF α in coinfecting cells than in non-infected	24082069

	swIAV: H1N1 A/sw/Potsdam/15/1981, H1N1 A/sw/Bad Griesbach/IDT5604/2006, H3N2 A/sw/Herford/IDT5932/2007, H3N2 A/sw/Damme/IDT5673/2006, H1N1 A/Swine/Shanghai/1/2005 Ss: 10 and 10 cpsΔEF swIAV then Ss Interval: 2h or assay: up to 72h	NPTr	Co-localization of Ss and swIAV	-swIAV enhanced bacterial adhesion. -Ss adhesion increased via the capsular α -2,6-linked sialic acid recognized by HA expressed by swIAV- infected cells -Bacterial coinfection had a negative effect on the replication of swIAV.	ND	26297001
PRRSV	PRRSV: IAF-Klop Ss: P1/7 PRRSV then Ss Interv: 2h, Duration: 5h, 12h	BMDC Monocytes	-BMDC more permissive to PRRSV than monocytes -Ss intracellular	-PRRSV impaired the phagocytosis of Ss.	- Increased pro-inflammatory response of BMDC to Ss after a pre-infection with PRRSV -Additive effects for CCL4, CCL14, CCL20, and IL15 -Synergistic effects for IL6 , CCL5, and TNF α -Little effect of PRRSV pre-infection on monocyte response to Ss	27213692

BMDC: Bone Marrow Dendritic Cell, NPTr: Newborn Pig Trachea, PK15: Porcine Kidney 15, MDMs: Monocyte Derived Macrophages, ROS: Reactive Oxygen Species, SJPL: St-Jude Porcine Lung cell, swIAV: swine Influenza A Virus, PRRSV: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PCV2: Porcine Circovirus type 2 (subspecies a and b when indicated)

Additional file 1D: Description of experimental assays carried to study bacterial/viral coinfections and superinfections involved in PRDC (in vivo)

Bacterium	Virus	Protocols	Clinical signs	Macroscopic lesions	Microscopic lesions	Pathogen detection	Results	Reference PMIDs
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	swIAV	swIAV: H1N1 A/Swine/IA/407/76/92 Mhp: 232 Mhp then swIAV Interv: 21 days	Coinfected pigs coughed significantly more than the others.	More severe pneumonia in coinfecting pigs than in others	No difference	Similar distribution	No impact on antibody levels in serum	11427564
		swIAV: H1N1 A/Sw/Hok/2/81 Mhp: E-1 Mhp then swIAV Interv: 7/21 days	Clinical signs (coughing and fever) were more observed in coinfecting pigs.	H1N1 infection, 7 or 21 days after Mhp infection, resulted in a greater percentage of dark red-lung lesions.	Bronchial epithelial lesions and interlobular oedema only observed in the dual infection groups	-No impact of swIAV on the Mhp titers -No impact of Mhp on virus duration shedding	No impact of Mhp on the antibody levels against H1N1	15036530
		swIAV: H1N1 A/Sw/Cotes d'Armor/0231/06 and H1N2 A/Sw/Cotes d'Armor/0113/06 Mhp: 116 Mhp then swIAV Interv: 21 days	Mhp pre-infection increased influenza clinical signs.	Mhp increases the mean lesion score for the Mhp+H1N1 group not for the Mhp+H1N2 group.	Exacerbation of bronchial pneumonia and superinfection with cellular exudates in the alveoli, more marked in the lungs of Mhp+H1N1 group than in Mhp+H1N2 group	-No impact of Mhp on both swIAV shedding nor on H1N2 multiplication in lungs -At 7dpi H1N1 detected in co- but not in single inoculated pigs -Less Mhp in the Mhp+H1N2 group than in the Mhp or Mhp+H1N1 groups	Higher humoral immune response to H1N2 infection in the Mhp+H1N2 group than in the H1N2 group at 7dpi swIAV	22261237
		swIAV: H1N1 A/Sw/Cotes d'Armor/0231/06 Mhp: 116 Mhp then swIAV Interv: 21 days No single-infected group in this study	Some clinical signs were observed in the coinfecting group (fever, cough and decreased mean weight gain).	Extensive pneumonia lesions	bronchiolitis, broncho-interstitial, and interstitial pneumonia	Detection of both pathogen in all lung lobes	Mhp infection induced an oxidative stress before H1N1 infection.	23266108

	swIAV: H1N1 A/Sw/Cotes d'Armor/0231/06 Mhp: 116 Mhp then swIAV Interv: 21 days No single-infected group in this study	Feed-restricted pigs presented shorter hyperthermia and a positive mean weight gain over post-H1N1 infection whereas animals fed <i>ad libitum</i> lost weight.	All coinfecting pigs had macroscopic lesions of pneumonia.	All coinfecting animals developed bronchiolitis, broncho-interstitial and interstitial pneumonia.	-Mhp genome detected in all lung lobes -swIAV genome detected in nasal swabs and lung tissues	Both infection and feed restriction reduced postprandial glucose concentrations, indicating changes in glucose metabolism.	25101681
	swIAV: H1N1 A/Sw/Cotes d'Armor/0231/06 Mhp: 116 Mhp then swIAV Interv: 21 days No Mhp single-infected group in this study	No impact of the Mhp pre-infection on clinical signs usually induced by swIAV	No impact of the Mhp pre-infection on pneumonia lesions	Earlier and more extended inflammatory lesions in coinfecting compared to single-infected pigs	No impact of the Mhp pre-infection on viral excretion and multiplication	Coinfecting pigs presented an earlier influx of CD163+ cells in cardiac lobes and a greater influx of neutrophils and of pro-inflammatory cytokines in BALF than single-infected pigs.	27498789
PRRSV	PRRSV: MN-30100 and MN-184 Mhp: 232 Mhp then PRRSV Interv: 21 days	Coinfection exacerbated the disease and increases the duration and the severity of the clinical signs.	ND	ND	Mhp increased the replication of PRRSV in lymphoid tissue and blood.	ND	16506914
	PRRSV: VR2385 Mhp: 11 Interval: few hours	Coinfection PRRSV/Mhp increased clinical signs of respiratory disease.	Dual infection PRRSV/Mhp increased pneumonia lesions.	Microscopic lesions (Mhp) were most severe in coinfecting pigs.	No observation regarding coinfections	No observation regarding coinfections	10649626
	PRRSV: VR2385 Mhp: 232 Interv: 0	Clinical disease was more severe in coinfecting pigs.	Pneumonia was more frequent and pronounced in coinfecting pigs.	No difference registered between single and dual infections	-PRRSV detection was prolonged in the presence of Mhp. -Mhp infection was not	-IL12 and IL10 transcript expressions were higher in coinfecting pigs than in single-infected.	14583150

				altered by PRRSV.	-Higher production of IFN γ and IL10 in BAL fluids in coinfecting animals than others		
	PRRSV: VR2385 Mhp: 11 Mhp and PRRSV simultaneously or with an interval: -Mhp 21 days before PRRSV -Mhp 10 days after PRRSV	Pigs infected with both Mhp and PRRSV had more severe clinical respiratory disease.	Coinfection induced an acute interstitial pneumonia.	PRRSV infection increased the microscopic lesions typical of Mhp.	-No evidence of increased numbers of cells containing PRRSV antigen in tissues with Mhp lesions -No significant differences in Mhp titer between groups	-PRRSV infection increased the severity of the Mhp-induced pneumonia. -Mhp-infected pigs showed increased PRRSV-induced pneumonia lesions.	9986823
	PRRSV: VR2385 Mhp: 232 Simultaneous infections	Increased clinical respiratory disease and slower viral clearance	Coinfection increases the percentage of lung showing visible lesions.	ND	ND	-The pigs coinfecting with PRRSV and Mhp had increased levels of IL1 β , IL8, IL10, IL12, and TNF α .	15358650
	PRRSV: MN-30100 and MN-184 Mhp: 232 Simultaneous infections	Coinfection with PRRSV and Mhp increased the severity of the clinical disease.	ND	ND	-Large quantities of virus were detected in the aerosols	-Coinfection did not influence the concentration of PRRSV in aerosols.	17042383
	PRRSV: IND-5 Mhp: P5722-3 Interv: 7 days	No difference between single and coinfecting pigs	ND	No difference between single and coinfecting pigs	ND	-PRRSV infection did not increase the severity of Mhp infection in piglets.	8734647
PCV2	PCV2: ISU-40895 Mhp: 232 Mhp then PCV2 Interval: 14 days	Dual-infected pigs had moderate dyspnea, lethargy, and reduced weight gain.	Increased severity of pneumonia lesions in coinfecting pigs	Higher PCV2-associated microscopic lesions in lung and lymphoid tissues of coinfecting pigs than others	-Mhp pre-infection increased the amount of PCV2.	-Higher serum antibody response to Mhp and higher antibody response to PCV2 in dual-infected pigs	15557072

		PCV2: ISU-40895 Mhp: 232 Mhp then PCV2 Interv: 14 days	Dual-infected pigs showed mild-to-severe respiratory disease. No difference with Mhp single-infected pigs	Pigs infected with Mhp (alone or in association) had higher lung lesion scores than pigs infected with PCV2.	Lymphoid depletion and histiocytic infiltration in tracheobronchial lymph nodes in groups infected with PCV2	-No impact of Mhp on PCV2 detection in sera	-No effect of coinfections	21176971
		PCV2: I-12/11 Mhp: 98 Simultaneous infections	No impact of infections	No differences in the mean lung score detected between Mhp-inoculated groups	Mild microscopical lesions in one or two pigs infected with PCV2 (single and coinfections)	-No differences in PCV2 load or duration of viremia between groups -No differences in Mhp load in nasal swabs between groups	-No impact of Mhp on PCV2-antibody titer -No impact of PCV2 on Mhp seropositive pigs	22522076
		PCV2: SNUVR000463 Mhp: SNU98703 Interv: 14 days	ND	Higher gross lung lesions in the dually infected groups	Dually infected pigs had more severe PCV2-induced pulmonary and lymphoid lesions than others. Coinfection did not significantly potentiate the Mhp-induced pulmonary lesions.	-Dually challenged pigs had increased PCV2-viremia but no difference in Mhp nasal shedding.	-No impact of the coinfection on the immunological responses against Mhp -Higher immunological responses against PCV2 in the PCV2 single-infected group compared to the coinfecting group	24631087
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	swIAV	swIAV: H1N1 A/Poland/Swine/14131/20141 App: 4226 serotype 2 Simultaneous infections	Clinical signs were more severe in the coinfecting group.	Macroscopic lesions were more severe in the coinfecting group.	ND	ND	Increased concentrations of IL1 β , IL8, and IFN α in the lungs of coinfecting animals	29978082

	swIAV: H1N1 A/Poland/Swine/14131/2014 App: PIWetHps192/2015 Simultaneous infections	Clinical signs were more severe in the coinfecting group.	swIAV-like lesions were more severe in coinfecting pigs.	ND	-Coinfection enhanced the nasal swIAV shedding and virus replication. -No impact of swIAV on App load and shedding	-Earlier detection of anti-HI antibodies in the coinfecting group -Strongest SAA and Pig-MAP responses in coinfecting pigs	29202835
PRRSV	PRRSV: LV-Ter Huurne App: 17415 Interv: 8 days PRRSV then App	ND	ND	ND	ND	-The infection affected the IgM, not the IgG isotype.	29126442
	PRRSV: Lelystad swIAV: H3N2 App: 1421 -PRRSV/swIAV: Interv: 7 days PRRSV then swIAV -PRRSV/App: Interv: 2 days App then PRRSV	PRRSV/H3N2: PRRSV infection does not aggravate the acute stage of H3N2 infection but could make influenza infection more chronic. -Coinfection PRRSV/App: App produced more severe disease.	Coinfection PRRSV/H3N2: Inflammation of the bronchiolar wall more pronounced	ND	-PRRSV-positive macrophages in the lungs and rare influenza-positive cells in the bronchiolar epithelium -App lesions were surrounded by PRRSV-positive macrophages.	-No impact of a previous PRRSV infection on the acute or chronic stage of influenza infection -Lung alveolar macrophages and bronchiolar epithelial cells do not become more susceptible for infection after App infection.	9220621
	PRRSV: LV-Ter Huurne App: 17415 PRRSV then App Interv: 8 days	ND	Coinfection significantly increased the pathological score.	Coinfection increased lymphomonocytic cell infiltration in the lung.	ND	ND	27606818
ADV	ADV: strain YS-81 App: ZF-867	Coinfecting pigs showed more severe clinical	Pneumonic lesions were more important in coinfecting pigs.	ND	ADV shedding was increased in presence of App.	App increased the severity of ADV infection in pigs.	8399736

		serotype 1 ADV then App Interv: 7 days	signs, especially fever.					
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	swIAV	swIAV: H1N1 A/Swine/Minnes ota/37 866/1999 (MN99) Bb: KM22 Simultaneous infections	ND	Pneumonia lesions were more severe in the coinfecting group.	Lesions were more severe in the coinfecting group (peribronchiolar lymphocyte infiltration, accumulation of neutrophils, and alveolar epithelial cell necrosis)	-No impact of coinfection on swIAV shedding but enhancement of Bb burden in the coinfecting group.	-Higher type I IFN response and enhanced IL1 β and IL8 mRNA expression in coinfecting group than others	20558274
		swIAV: H1N1 A/Swine/Minnes ota/37 866/1999 Bb: KM22 Simultaneous infections	ND	ND	ND	ND	Coinfection induced an enhanced expression of TLR3.	21561668
		swIAV: H1N1 A/sw/Poland/KP R9/2004 Bb: field strain Simultaneous infections	Hyperthermia for a longer period in the coinfecting group than others	More severe and extensive lesions in coinfecting piglets than others	ND	-No impact of swIAV on Bb in lung -Bb infection delays the swIAV clearance in the lung.	-Higher mRNA levels for IFN α and IL8 in BALF of coinfecting pigs than others	24629899
		swIAV: H1N2 A/swine/Minnes ota/03012/2010 Bb: KM22 Interv: 28 days	ND	Higher percentage of the lung tissue affected in the coinfecting group than others	More severe in coinfecting pigs than others	-No impact of swIAV on the Bb respiratory tract colonization -No impact of Bb on virus multiplication in the lung	-Higher level of MCP1 in the coinfecting group compared to single- infected groups	30337924
<i>Pasteurella multocida</i>	swIAV	swIAV: H1N1 A/sw/Poland/KP R9/2004 Pm: field strain Simultaneous	Coinfecting pigs had clinical signs (no single- infected).	-Lung lesions observed at 3, 5, and 10 days post- infection -Atrophy of	ND	-Viral shedding from 2 to 7 dpi -No virus detected at 10 dpi -Pm detected in nasal	-Increased concentrations of CRP, SAA, haptoglobin, and MAP in serum	23332090

	infections		turbinates observed at 10 days post-infection only		swabs from 3 to 10 dpi and lungs		
	swIAV: H3N2 Sw/Ghent/172/2008 Pm: field strain Simultaneous infections	-All coinfecting pigs had clinical signs. -Less severe disease than after H1N1+ Pm coinfection [73]	Various lesions in the coinfecting pigs	ND	-Virus detected in nasal swabs and lungs in the first days after inoculation -Pm detected in nasal swabs and lungs	-Lower levels of CRP, SAA, and MAP than after H1N1+Pm coinfection [73]	26161700
PRRSV	PRRSV: NADC-21 Pm: P-3480 Bd: KM22 PRRSV then Pm Interv: 7 days	Coinfecting animals showed no difference in clinical signs from single-infected ones.	No difference between coinfecting and single-infected regarding gross lesions	ND	No effect of coinfection on pathogens' replication	ND	11327458
	PRRSV: VR2332 ADV: 4892 Pm: A52 and A24 Interv: 5 days PRRSV then Pm ADV then Pm	Central nervous clinical signs detected only in animals challenged with ADV	ADV/Pm: More extensive pneumonic lesions than in other groups	-ADV/Pm and PRRSV/Pm: interstitial pneumonia, catarrhal purulent bronchopneumonia and polymorphonuclear neutrophils in alveoli -ADV/Pm: Meningo-encephalitis and purulent rhinitis	ND	-PRRSV/Pm, pneumonic lesions very slight compared to ADV/Pm -The role of PRRSV on the development of pulmonary lesions is unclear.	9220619

swIAV	swIAV: H1N1 A/Poland/Swine/14131/2014 Hp: PIWetHps192/2015 Simultaneous infections	No differences between swIAV and swIAV/Hp groups	No differences between swIAV and swIAV/Hp groups	ND	-No effect of swIAV on the Hp shedding but Hp infection increased swIAV shedding. -Enhanced Hps and swIAV lung replication in coinfecting animals	-More important increase in cytokine production (IFN γ , TNF α , IL1 β , IL6 and IL10) and APP (haptoglobin, C-reactive protein, SAA and MAP) after coinfection	29202835
PRRSV	PRRSV: VR2332, SDSU73, rJXwn06, rSRV07 Cocktail of Hp, <i>Streptococcus suis</i> , and <i>Actinobacillus suis</i> Bacteria then PRRSV, 1 week later	-More severe clinical signs in coinfecting groups -Severity was also dependent of the PRRSV strain.	ND	Bacteria/PRRSV: bronchopneumonia with alveoli and larger airways containing neutrophils and/alveolar necrosis	ND	-PRRSV infection causes interstitial pneumonia and predisposes to secondary bacterial bronchopneumonia in a strain dependent manner. -The severity of disease could depend of the virulence of the PRRSV strain and the development of secondary bacterial infection.	28619168
	PRRSV: HuN4 HUN4 Hp: Nagasaki Only alveolar macrophages were coinfecting	/	/	/	-Bacterial sequencing in broncho-alveolar lavage: 11 bacterial species were increased after PRRSV infection, including Hp.	Hp proliferates faster in PRRSV-infected piglets.	28532803
	PRRSV: SX-1 Hp: LZ Interv: 5 days PRRSV then Hp	-Single- and coinfections increase rectal temperatures. -Higher temperatures in coinfecting pigs than others -High mortality in coinfecting pigs	More lesions of the ears and dorsum in coinfecting pigs	Coinfection PRRSV/Hp leads to severe interstitial pneumonia.	-Higher Hp loads were observed in coinfecting pigs than in single-infected pigs.	-Coinfection increases the amount of Hp in blood at 3 days post-infection. -PRRSV could accelerate HP infection.	22460022

	PCV2	PCV2: WH (2b) Hp: MD0322 Simultaneous infections	Coinfected piglets developed dyspnea, anorexia, prostration, and weight lost (more than single-infected pigs)	ND	Coinfection resulted in severe widened alveolar septa, lymphocyte infiltrations in lungs, and lymphocyte depletion.	-Increased amount of virus in serum and tissues in coinfecting pigs	-Coinfection resulted in slower generation and lower levels of anti-PCV2 antibodies. -Lower numbers of blood leukocytes in coinfecting pigs than others	29157279
<i>Streptococcus suis</i>	swIAV	swIAV: H1N1 A/swine/Hubei/101/2009 Ss: 05ZY Interv: 3 days swIAV then Ss	More severe clinical signs in the coinfecting group than in other groups	More serious lung lesions in the coinfecting groups than in other groups	More important lung damages (extensive cellular infiltrates, bleeding, and cellular debris) in the coinfecting pigs than others	-Higher viral titers in nasal swabs and lung 6 days post-infection in the coinfecting pigs than others -No impact of swIAV on the bacterial loads	Genes related with the immune response and apoptosis were highly overexpressed in the coinfecting group.	25906258
	PRRSV	PRRSV: VR2385 Ss: ISU VDL 40634/94 - Interv: 7 days PRRSV then Ss	Highest mortality rate in the dually infected group	No significant differences between single- and coinfecting groups	No significant differences between single- and coinfecting groups	Presence of PRRSV and Ss more important in dually infected pigs	ND	10714643
		PRRSV: HuN4 Ss: WC0711 Simultaneous infections	Coinfecting pigs died of an acute disease.	Several pigs in the coinfecting group had pleuritis.	Severe lesions in died pigs	-Bacteremia and viremia were observed in all the coinfecting pigs.	-The coinfection increased the pathogenicity and the mortality.	20696031
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	PRRSV	PRRSV: LMY Mhr: EH5 Simultaneous infections	/	The lung tissue from coinfecting animals showed more severe histopathological signs.	The lung tissue from coinfecting animals showed more severe histopathological signs.	ND	-More severe histopathological signs in coinfecting piglets than in others	27436444
	PCV2	PCV2: YJ Mhr: DL PCV2 then Mhr or Mhr then PCV2 or simultaneous infections Interv: 0 to 7	Lower average daily weight gains in coinfecting pigs than in others	Dual infection resulted in more severe macroscopic lung lesions.	Dual infection resulted in more severe microscopic lung lesions.	-Larger amounts and wider range of tissue distribution of PCV2 in coinfecting pigs than in others	-Higher levels of PCV2 and Mhr antibodies in the coinfecting groups -Significant increase of TNF α , IL2, and IL6 in coinfecting pigs compared to single-infected	26711038

days

<i>Staphylococcus aureus</i>	swIAV	swIAV: H3N2 A/Swine/Minnesota/1145/2007 Sa: NRS123 swIAV then Sa Interv: 3 to 6 days	Animals infected with Sa 5 days after swIAV infection showed a second increased body temperature.	Dually infected animals showed more red hepatization of the lung than other animals.	No difference between H3N2 and H3N2/Sa groups	-Only dually infected animals had viable Sa in the lung, lymph nodes, and spleen 48 h after bacterial infection.	Sa impacted swIAV infection.	23074662
------------------------------	--------------	--	---	--	---	--	------------------------------	----------

Interv: Interval, dpi: days post-infection, ND: Not Determined, ADV: Aujeszky's Disease Virus, swIAV: swine Influenza A Virus, PRRSV: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PCV2: Porcine Circovirus type 2 (subspecies a and b when indicated)

Additional file 1E: Description of in vivo experimental assays carried to study the bacterial/bacterial infections and superinfections involved in lung diseases of PRDC

Bacterial species	Protocol / interval between infections (CI or SI*)	Clinical signs	Macroscopic lesions	Main laboratory results			Reference PMID
				Microscopic lung lesions	Bacterial detection	Immune responses	
<i>M. hyopneumoniae</i> (Mhp) and <i>A. pleuropneumoniae</i> (App)	-Mhp and App serotype 9 / 0 day (CI)	In the three groups:	In the three groups:	In the three groups:	<i>Mhp</i> and <i>App</i> were detected by PCR and culture without further information on multiplication.	-In the three groups: IgG anti-Mhp and anti App serotype 9 -2-3 weeks after infection, similar ELISA titers	18977616
	-App serotype 9 then Mhp / 28 days (SI)	mortality, hyperthermia, severe coughing, and decreased average daily weight gain.	pneumonia, pleurisy, fibrinous and haemorrhagic pleuro-pneumonia, pulmonary necrosis, and hypertrophy of the tracheo-bronchial lymph nodes	lesions of early phase of App infection, haemorrhage, vascular thrombosis, oedema, necrosis and the presence of fibrinous exudate / lesions of chronic phase of App infection, marked fibrosis around areas of necrosis and fibrinous pleuritis / lesions of Mhp infection, infiltrating lymphocytes in the peribronchiolar area, interstitial pneumonia, lymphoid nodules, and collapse of the alveoli			
	-Mhp and App serotype 9 / 28 days (SI)						
	-Duration of the experiment: 30-65 days						
	-Mhp then App serotype 5/ 14 days (SI)	ND	ND	ND	ND	Phagocytosis suppression is more important in dually infected pigs.	2301832
	-Mhp then App serotype 5/ 28 days (SI)						
	-Mhp then App serotype 5/ 35 days (SI)						
	-Duration of the experiment: 6 weeks - + 3 days						
	-Mhp then App type I / 7 days (SI)	Higher mortality and clinical signs in App single infected animals	Fibrinous and haemorrhagic pleuro-pneumonia are less severe in pigs pre-infected with Mhp	ND	ND	-IgG anti App: seropositivity 1 week after infection -Titers of these IgG were lower	2531628
	-Duration of the experiment: 14 days						

			compared to App single infected pigs.			in double infected pigs compared to App single infections.	
	-Mhp then App /16 days (SI) -Duration of the experiment: 35 days	Mortality and severe clinical signs in coinfection conditions	Coinfections showed more extensive and widespread pneumonic lesions than single-infections.	Haemorrhagic fibrinous pleuropneumonia, chronic form with necrotic nodules	-Mhp and App titers in the upper respiratory tract were higher in dually infected animals	No correlation between antibody titers to App and intensity of the lung lesions	6513243
<i>M. hyopneumoniae</i> and <i>P. multocida</i> (Pm)	-Mhp then Pm / 23 days (SI)	-Aggravated fever, cough and dyspnea in dually infected animals -Similar ADWG but dually infected pigs consumed 60% more food.	Extensive exudative pneumonia	Enlarged septa, large increase in the number of PMN in alveoli and bronchi, alveolar and interstitial haemorrhages, marked alveolar macrophage proliferation, and perivascular and alveolar lymphocytic infiltration with fibrin deposition	-Pm isolated exclusively from dually infected pigs -Mhp positive pigs were higher in dually infected animals.	ND	3196973
	-Mhp then Pm / 13 weeks (SI) – group 1 -Mhp vaccination (3 and 8 week-old) then Mhp inoculation then Pm / 4 weeks respectively (SI) – group 2 -Mhp inoculation then Pm / 4 weeks (SI) – group 3 -Pm alone – group 4 -Duration of the experiment: 15 weeks	-Coughing in all groups with the highest frequency of coughing in Mhp and Pm inoculated group (group 3) -Dyspnea in group 3 (Mhp+Pm)	Pneumonia in all groups with the most severe lesions in dually infected group 3	-Peribronchiolar lymphocytic inflammation in all groups (lowest score in group-4 pigs) -Alveolitis in all groups (highest score in group-3 pigs)	Mhp induced the multiplication of Pm since Pm was detected in dually infected pigs of group 3 only but not in single infected or dually infected vaccinated pigs against Mhp of group	Seroconversion to Mhp in all groups with varying frequencies of seropositive pigs	8125807

					2. -Percentage of lung surface area with pneumonia correlated with the number of Pm colonies isolated in group 3.		
	-Mhp then Pm / 20 days (SI)	Coughing	Pneumonia	Bronchial and perivascular lymphoid accumulations in some pigs	Mhp Pm App in nasal swabs	Seroconversion to App was higher in pigs pre-infected with Mhp.	22632286
	-Mhp then Pm / 13 days (SI)	Coughing without significant differences between groups	Pneumonia in all the groups	ND	Mhp multiplication is not affected by App.	ND	28499212
<i>M. hyopneumoniae</i> and <i>P. multocida</i> and <i>A. pleuropneumoniae</i>	-Mhp then Pm then App serotype 2 / 7 days and 7 days, respectively (SI)	Sneezing, depression, forced breathing, coughing, and elevated rectal temperature at some points after Pm or App infections	Catarrhal pneumonia and purulent foci in the diaphragmatic lobes	-Lymphohistiocytic bronchitis and interstitial pneumonia peribronchitis -Hyperplasia of the peribronchial lymph nodes, lymphohistiocytic, and infiltration of the nasal mucosa	Mhp and App detection	Seroconversion to Mhp	11768127
<i>M. hyopneumoniae</i> and <i>M. hyorhinis</i> (Mhr)	-Mhp at 6 weeks of age then Mhr at 7 weeks of age / 7 days (SI) -Duration of the experiment: 33-36 days	Coughing, Hyperthermia, and lower ADWG during the third week	Pneumonia, pleuritic, and pericarditis	ND	Mhp and Mhr (PCR)	-IgG anti-Mhp: seropositivity from 13 dpi -Higher haptoglobin concentration	31030844

(additive effect)							
<i>M. hyopneumoniae</i> and <i>M. flocculare</i> (Mfloc)	-Mhp at 6 weeks of age then Mfloc at 7 weeks of age / 7 days (SI) -Duration of the experiment: 33-36 days	Coughing and lower ADWG during the third week	Pneumonia	ND	Mhp and Mfloc (PCR)	-IgG anti-Mhp: seropositivity from 13 dpi - Higher haptoglobin concentration (additive effect)	31030844
	-Mhp and Mfloc / 0 days (CI) -Mfloc then Mhp / 6 weeks (SI) -Duration of the experiment: 7 to 24 weeks post-infection	Clinical signs following Mhp infection such as coughing are unchanged in presence of Mflo	No difference registered between dually infected and Mhp single infected pigs	Histopathology revealed characteristic pneumonia induced by Mhp in all pigs without any difference between single and dually infected groups.	-Mhp and Mfloc were detected by IFA and cultutre. -The poor colonization of the respiratory tract by Mfloc was not affected by Mhp.	Mhp induced a stronger antibody response that was not influenced in the presence of Mfloc in dually infected groups.	1570675
<i>B. bronchiseptica</i> (Bb) and <i>H. parasuis</i> (Hps)	Bb and Hps / 0 day (CI) Bb then Hps / 7 days (SI) Duration of the experiment: 2 weeks	Coughing was reported in case of Bb and/or Hp infection while Bb caused sneezing in infected pigs.	-Pneumonia: areas of tan-red consolidation with well-demarcated borders and a cranial ventral distribution (no statistical differences between the groups)	ND	Bb predisposes to Hps colonization while Hps reduced the multiplication of Bb in the nasal cavity.	ND	15019114
<i>B. bronchiseptica</i> and <i>P. multocida</i>	Bb then Pm / 4 days (SI) Duration of the experiment: 25 days	ND	Atrophic rhinitis scores were higher in dually infected compared to Pm single	ND	Bb enhanced the multiplication of Pm.	ND	17624695

infected pigs.

Bb then Pm / 7 days (SI) Duration of the experiment: 25 days	Clinical signs such as sneezing, coughing, fever and weight loss were higher in dually infected group compared to Pm single infected group.	Atrophic turbinates and mucopurulent nasal discharge were exclusively noted in animals pre-infected with Bb.	ND	Bb enhanced the multiplication of Pm in the upper respiratory tract.	ND	11327458
--	---	---	----	--	----	----------

ADWG: Average Daily Weight Gain, CI: Coinfection, IFA: Immunofluorescence assay, SI: Superinfection, swIAV: swine Influenza A Virus, PRRSV: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PCV2: Porcine Circovirus type 2 (subspecies a and b when indicated), PRDC: Porcine Respiratory Disease Complex

ANNEXE 2 : Attestation de management qualité de la thèse



Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort

Service Management Qualité

Thèse préparée par Juliette BOUGON

« Etude immuno-virologique de la co-infection par les virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin et de l'influenza porcin : « Mieux comprendre les interactions virales pour mieux contrôler les infections »

Attestation de management qualité de la thèse
Par Eric CHORIN, chef du Service de Management Qualité

Les travaux de thèse conduits par Juliette BOUGON se sont déroulés sous management de la qualité, dans l'unité « Virologie, Immunologie Porcines » (U VIP) à compter de Janvier 2019. Ce qui s'est concrétisé par la rédaction, dès le début des travaux et par la doctorante, d'un Plan de Management Qualité (PMQ) signé par elle-même, la Directrice de thèse, le Co-Encadrant de thèse et le Responsable qualité du Laboratoire.

Véritable engagement pour le management de la thèse, ce PMQ a deux normes pour référence :

- la norme NF EN ISO/CEI 17025 (Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais) appliquée dans ce projet, pour la gestion des ressources au sein de l'unité VIP ;
- la norme ISO 10006 (Systèmes de management de la qualité – lignes directrices pour le management de la qualité dans les projets) mise en œuvre pour la conduite du projet de thèse.

Le PMQ fait systématiquement le lien entre le sujet de la thèse, sa mise en œuvre et la formalisation de son déroulement. Avec ce document, ce sont des éléments d'organisation et de gestion des travaux de thèse qui ont été réfléchis, décidés et formalisés. Ce plan comprend notamment l'identification des « points critiques » dans le projet de thèse, les données de sortie attendues à chaque étape identifiée et des « revues de projet » conformément à la norme ISO 10006.

La mise en œuvre du PMQ

Comme pour toute démarche de management qualité, la conduite de la thèse s'est traduite par un suivi régulier de l'encadrement avec validation des travaux de la doctorante. De nombreuses données ont été enregistrées conformément aux engagements en termes de traçabilité.

Le management de projet a donné lieu à des vérifications de l'application des dispositions d'organisation formalisées dans le PMQ. Cela s'est notamment traduit par deux audits internes de management de projet conduit par le Chef du Service Management Qualité les 15 Juin 2020 et 05 Octobre 2021. Au cours de ces audits, aucune fiche de non-conformité n'a été notifiée : les dispositions du PMQ ont donc été parfaitement suivies par la doctorante.

Les exercices de traçabilité faits par l'auditeur se sont révélés conformes aux engagements de l'équipe de thèse. Plusieurs cahiers de laboratoires normalisés ont été utilisés, y compris pour les réunions de l'équipe de thèse. Les cahiers examinés sont extrêmement bien tenus et visés régulièrement par

l'encadrement. La doctorante a aussi stocké ses nombreuses données dans un dossier électronique très bien structuré permettant de retrouver aisément l'ensemble des données brutes et des données analysées.

Les réunions prévues d'avancement du projet et de suivi de la doctorante ont effectivement été réalisées, les comptes rendus sont disponibles et permettent d'identifier le but de la réunion, les données d'entrée et de sortie, la validation des différentes étapes du projet, les éventuels besoins de réorientation des recherches...

Les audits ont permis d'identifier :

- le gros travail réalisé par l'équipe et en particulier par la doctorante avec 1 publication en rang 1 en attente de décision et deux publications en rang 3 parues;
- la qualité de la traçabilité des travaux conduits ;
- la rigueur du cheminement intellectuel de la doctorante dans la conduite de son projet.

Bilan du management qualité de la thèse

Le déroulement de la thèse sous management qualité, a d'abord permis à Juliette BOUGON de découvrir deux référentiels qualité qui, dans l'esprit au moins, lui seront nécessaires pour sa carrière professionnelle et directement bénéfiques pour des fonctions éventuelles au sein d'un laboratoire ou dans le management d'un projet.

En second lieu, ce management qualité lui a été utile sur plusieurs points :

- la formalisation la plus complète possible du projet scientifique, en particulier au démarrage ;
- l'importance de clarifier les rôles respectifs des différents acteurs du projet mais aussi de s'intégrer dans leur agenda respectif ;
- l'intérêt de réfléchir, au moins au début du projet, aux éventuels points critiques et aux actions préventives nécessaires pour les maîtriser. Dans le cas présent, cet aspect « point critique » a été parfaitement géré ;
- la nécessité de mettre en œuvre la traçabilité des ressources (équipements principaux suivis et vérifiés) afin de pouvoir analyser dans les meilleures conditions tout résultat inattendu ;
- l'importance de formaliser tous les résultats et les cheminements intellectuels.

Au final, je suis convaincu que Juliette BOUGON a su mener avec une grande rigueur son projet scientifique en ayant partagé dès le début de sa thèse avec son encadrement la démarche de management qualité.

Fait à Ploufragan le 06/10/2021



Eric CHORIN
Chef du Service Management Qualité

Titre : Etude immuno-virologique de la co-infection par les virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin et de l'influenza porcin : Mieux comprendre les interactions virales pour mieux contrôler les infections

Mots clés : Complexe respiratoire porcin, interférence virale, co-infection, réponses immunitaires innée et adaptative, interféron, vaccin vivant atténué

Résumé : Les virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRPV) et de l'influenza A porcin (swIAV) sont deux acteurs majeurs du complexe respiratoire porcin. Si les connaissances sur les mono-infections SDRPV ou swIAV sont nombreuses, les interactions possibles entre ces virus sont encore largement incomprises. De plus, les vaccins vivants atténués (*modified live vaccine*, MLV) anti-SDRPV sont administrés chez le porcelet lorsqu'une infection à swIAV peut survenir.

Les objectifs de ce projet de thèse étaient d'étudier les effets cliniques, virologiques et immunologiques de la co-infection SDRPV/swIAV chez le porc et d'évaluer l'effet d'une infection grippale sur la vaccination MLV.

Nous avons montré qu'une infection à swIAV réduit la multiplication du SDRPV au niveau pulmonaire, retarde la virémie MLV sans diminuer l'efficacité vaccinale et accélère la mise en place de la réponse cellulaire vis-à-vis du SDRPV.

Par ailleurs, une pré-infection SDRPV entraîne l'atténuation des signes cliniques, des réponses inflammatoires et antivirales liées à l'infection grippale, et augmente les taux d'anticorps anti-swIAV (IgG, IgA, anti-HA et neutralisants) au niveau pulmonaire. Des analyses de corrélation ont montré que l'induction de la voie de l'interféron de type I, laquelle est bloquée par le SDRPV mais stimulée par le swIAV, paraît jouer un rôle clé dans cette interférence virale bidirectionnelle. L'étude des mécanismes sous-jacents a été initiée via des expériences de co-infections dans un système de co-culture de macrophages pulmonaires et de cellules épithéliales de trachée de porc.

Les nouvelles connaissances acquises confirment l'importance de déterminer l'étiologie des syndromes respiratoires, pour adapter au mieux les moyens de maîtrise (dont les protocoles de vaccination) en tenant compte de l'ensemble des agents pathogènes impliqués.

Title : Immuno-virological study of co-infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus: better understanding of viral interactions for better infection control

Keywords : Porcine respiratory disease complex, viral interference, co-infection, innate and adaptive immune responses, interferon, modified live vaccine

Abstract: The porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and the swine influenza A virus (swIAV) are leading players of the porcine respiratory disease complex. While much is known about PRRSV and swIAV single-infections, the possible interactions between these two pathogens are still misunderstood. Moreover, the modified live vaccines (MLV) against PRRSV are injected to piglets when swIAV infection may occur.

The objectives of this thesis project were to study the clinical, virological and immunological outcomes of PRRSV/swIAV co-infection in pigs and to investigate the effect of swIAV infection on MLV vaccination.

We showed that a swIAV infection reduces PRRSV multiplication in lungs, delays MLV viremia without interfering with vaccine protection and accelerates

the induction of the cell-mediated response specific to PRRSV. In addition, PRRSV pre-infection attenuates the clinical signs, inflammatory and antiviral responses linked to influenza infection, and increases the anti-swIAV antibodies levels (IgG, IgA, anti-HA and neutralizing) in lungs. Correlation analyses showed that the induction of the interferon type I pathway, which is blocked by PRRSV but stimulated by swIAV, appears to play a key role in this bidirectional viral interference. The study of underlying mechanisms has been initiated through co-infection experiments in a co-culture system of alveolar macrophages and tracheal epithelial cells.

The new knowledge acquired confirms the importance of determining the etiology of respiratory syndromes, in order to improve the control measures (including vaccination protocols) by taking into account all the pathogens involved.