

Université de Montréal

Effet de la co-infection du circovirus porcin avec le virus de l'influenza porcin et le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin sur la pathogenèse virale

Par

Yaima Burgher Pulgaron

Département de pathologie et microbiologie,

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)
en sciences vétérinaires, option microbiologie

Avril 2023

© Yaima Burgher Pulgaron, 2023

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

Effet de la co-infection du circovirus porcine avec le virus de l'influenza porcine et le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine sur la pathogenèse virale

Présentée par

Yaima Burgher

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Levon Abrahamyan

Président-rapporteur

Carl A. Gagnon

Directeur de recherche

Guy Lemay

Membre du jury

Christian Savard

Examineur externe

Résumé

Les interactions entre le circovirus porcin de génotype 2b (PCV2b), le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) et le virus de l'influenza porcine (VIP) dans le complexe respiratoire porcin (CRP) sont souvent associées à une augmentation des signes cliniques respiratoires chez les animaux. L'objectif général de cette étude était de caractériser les effets et les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse de la co-infection de PCV2b avec le VSRRP ou le VIP dans des modèles cellulaires des voies respiratoires du porc. La réplication virale, la viabilité cellulaire, l'expression de l'ARNm des cytokines et la modulation de l'expression des gènes cellulaires induite par l'infection virale ont été évalués dans les cellules co-infectées *versus* les cellules infectées par un seul virus. Les résultats obtenus ont permis de confirmer que la réplication du PCV2b augmente en présence du VSRRP dans les cellules épithéliales des voies respiratoires porcines (NPTr) génétiquement modifiées pour exprimer le récepteur CD163 (NPTr-CD163), tandis que celle du VSRRP est diminuée. Il a été mis en évidence que le PCV2b provoque une diminution ou une augmentation de la réplication du VIP dans les cellules NPTr et les macrophages alvéolaires porcins (iPAM 3D4/21), respectivement. Cependant, la réplication du PCV2b n'est pas affectée en présence du VIP. L'expression des ARNm des cytokines varie différemment selon le modèle de co-infection analysé et le type cellulaire infecté. L'expression des interférons de type I (α/β) a été significativement réduite dans les cellules NPTr-CD163, co-infectées par le PCV2b et le VSRRP (PCV2b/VSRRP) par rapport aux mêmes cellules infectées uniquement par le PCV2b. Cependant, la co-infection du PCV2b et du VIP (PCV2b/VIP) a causé une augmentation synergique de l'expression des IFNs de type I et de type II dans les cellules NPTr, tandis que dans les cellules iPAM 3D4/21, le PCV2b a affecté la réponse des IFNs induite par le VIP. À la suite des analyses transcriptomiques, plusieurs gènes différentiellement exprimés ont été identifiés dans les cellules co-infectées ou infectées par un seul virus. Dans les cellules co-infectées PCV2b/VSRRP, le niveau d'expression de l'ARNm et de la protéine du gène cellulaire codant pour la phosphatase 1 à double spécificité (DUSP1) ont été significativement augmentés. La réduction de l'expression de DUSP1, à l'aide des petits ARN interférents (ou siRNA pour small

interfering RNA) dans les cellules co-infectées a significativement réduit la réplication du PCV2b, suggérant un rôle de DUSP1 dans la pathogenèse de la co-infection PCV2b/VSRRP.

Mots-clés : circovirus porcin, virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin, virus influenza A porcin, co-infection, DUSP1, pathogenèse virale, porc.

Abstract

Interactions of porcine circovirus genotype 2b (PCV2b), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and swine influenza virus (SwIV) in the porcine respiratory complex (PRC) are often associated with increased respiratory clinical signs in animals. The general objective of this study was to characterize the effects and molecular mechanisms involved in the pathogenesis of PCV2b co-infection with PRRSV or SwIV using cellular models of the porcine respiratory tract. Viral replication, cell viability, cytokine mRNA expression and modulation of cell gene expression induced by viral infection were evaluated in co-infected cells versus single infected cells. The results obtained confirmed that PCV2b replication increases in the presence of PRRSV in porcine respiratory epithelial cells (NPTr) genetically modified to express the CD163 receptor (NPTr-CD163), whereas PRRSV is decreased. It was demonstrated that PCV2b causes a decrease or an increase in SwIV replication in NPTr cells and porcine alveolar macrophages (iPAM 3D4/21), respectively. However, PCV2b replication was not affected in the presence of SwIV. The impact of co-infections on cytokine mRNA expression varied according to the co-infection model and the type of infected cell. Type I IFNs (α/β) expression was significantly reduced in PCV2b/PRRSV co-infected NPTr-CD163 cells compared to PCV2b single-infected cells. However, PCV2b/SwIV co-infection caused a synergistic increase in type I IFNs expression in NPT cells, while in iPAM 3D4/21 cells, PCV2b affected SwIV-induced IFN response. As result of transcriptomic analyses, differentially expressed genes were identified in co-infected and single infected cells. It was observed that in PCV2b/PRRSV co-infected cells, the mRNA and protein expression levels of the cellular gene coding for the dual specificity protein phosphatase 1 (DUSP1) were significantly increased. Knockdown of DUSP1 expression in co-infected cells, using specific siRNA, significantly reduced PCV2b replication, suggesting a role for DUSP1 in the pathogenesis of PCV2b/PRRSV co-infection.

Keywords: porcine circovirus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, swine influenza A virus, co-infection, DUSP1, viral pathogenesis, swine.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	6
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	12
Liste des sigles et abréviations.....	15
Remerciements.....	22
Chapitre 1 - Introduction.....	23
Chapitre 2 - Revue de littérature.....	26
2.1 Le complexe respiratoire porcin.....	26
2.1.2 Effets des co-infections dans le complexe respiratoire porcin.....	27
2.2 CIRCOVIRUS PORCIN (PCV).....	29
2.2.1 Aspects historiques.....	29
2.2.2 Taxonomie.....	30
2.2.3 Caractéristiques du virion, génome et protéines.....	31
2.2.4 Entrée et réplication virale.....	34
2.2.5 Tropisme cellulaire.....	37
2.2.6 Épidémiologie et pathogenèse virale.....	38
2.2.7 Réponse du système immunitaire dirigée contre le PCV.....	40
2.2.8 Prévention et contrôle.....	41
2.3 VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN (VSRRP).....	43
2.3.1 Aspects historiques.....	43

2.3.2	Taxonomie.....	43
2.3.3	Caractéristiques du virion, génome et protéines.....	44
2.3.4	Entrée et réplication virale.....	50
2.3.5	Tropisme cellulaire.....	52
2.3.6	Épidémiologie et pathogenèse virale.....	54
2.3.7	Réponse du système immunitaire dirigée contre le VSRRP.....	55
2.3.8	Prévention et contrôle.....	57
2.4	VIRUS DE L'INFLUENZA PORCINE (VIP).....	59
2.4.1	Aspects historiques.....	59
2.4.2	Taxonomie.....	60
2.4.3	Caractéristiques du virion, génome et protéines.....	61
2.4.4	Entrée et réplication virale.....	64
2.4.5	Émergence de nouveaux virus de l'influenza porcin.....	68
2.4.6	Tropisme cellulaire.....	70
2.4.7	Épidémiologie et pathogenèse virale.....	70
2.4.8	Réponse du système immunitaire dirigée contre le VIP.....	72
2.4.9	Prévention et contrôle.....	74
2.5	Les co-infections avec PCV2.....	77
2.5.1	La co-infection PCV2/VSRRP.....	77
2.5.2	La co-infection PCV2/VIP.....	78
2.6	Les interactions virales et leurs rôles dans l'infection virale et la réponse de la cellule infectée.....	80
2.6.1	Les interactions virus-virus.....	80
2.6.2	Les interactions virus-cellule hôte.....	81

Chapitre 3 - Problématiques	92
Chapitre 4 - Hypothèse et objectifs de recherche	92
4.1 L'hypothèse	92
4.2 Les objectifs de recherche.....	93
Chapitre 5 - Résultats	94
5.1 Premier article. <i>DUSP1</i> mRNA modulation during porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-infection regulates viruses replication	94
1. Introduction.....	97
2. Material and methods.....	99
2.1 Cell lines and viruses	99
2.2 PCV2b and PRRSV co-infection.....	100
2.3 Immunofluorescence assay.....	100
2.4 PCV2b and PRRSV genome copy number quantification.....	100
2.5 Viral replication kinetics	102
2.6 Cell viability assay.....	102
2.7 Cytokine mRNAs' expression.....	102
2.8 3' RNA-seq Transcriptome Library Preparation and Sequencing.....	103
2.9 Identification of differentially expressed genes.....	103
2.10 GO and KEGG Enrichment Analysis	104
2.11 <i>DUSP1</i> gene knockdown in PCV2b/PRRSV co-infected cells.....	104
2.12 Western blot assays	105
2.13 Statistical analyses	106
3. Results	106
3.1 NPTr-CD163 cells, a new model for PCV2b/PRRSV co-infection studies	106

3.2 PCV2b and PRRSV dual infection modulates viral replication kinetics in NPTr-CD163 cells.....	107
3.3 PCV2b/PRRSV co-infection decreases cell viability in regards to PRRSV-single-infected cells.....	108
3.4 Cytokines mRNA expression modulation in PCV2b/PRRSV co-infected cells	109
3.5 Identification of differentially expressed genes and enrichment analysis	110
3.6 PCV2b and PRRSV co-infection upregulates <i>DUSP1</i> mRNA and protein expression .	112
3.7 Transient knockdown of <i>DUSP1</i> reduces PCV2b replication while it enhances PRRSV replication in PCV2b/PRRSV-infected cells	113
3.8 Protein network analysis revealed interaction of <i>DUSP1</i> with the protein translocation machinery of the endoplasmic reticulum	115
4. Discussion	117
5. Conclusions.....	120
References.....	122
5.2 Deuxième article. Porcine circovirus modulates swine influenza virus replication in pig tracheal epithelial cells and porcine alveolar macrophages.....	140
1. Introduction.....	142
2. Materials and Methods	144
2.1. Cells	144
2.2. Viruses	144
2.3. Immunofluorescence Assay	145
2.4. PCV2b/SwIV Co-Infection.....	145
2.5. Cell Viability Assay	146
2.6. Cytokine mRNAs Expression in PCV2b- and/or SwIV-Infected Cells.....	146
2.7. 3' mRNA-seq Library Preparation and Sequencing	147

2.8. Bioinformatic Analysis	147
2.9. Statistical Analyses	148
3. Results	148
3.1. Modulation of Swine Influenza A Virus Replication in Co-Infected PCV2b/SwIV H1N1 Cells	148
3.2. Cell Viability Assay	150
3.3. Modulation of Cytokines' mRNAs Expression in Co-Infected Cells.....	152
3.4. Differentially Expressed Genes (DEGs) and Pathway Enrichment Analysis in PCV2b-, SwIV H1N1- and PCV2b/SwIV H1N1-Infected Cells	154
4. Discussion	157
5. Conclusions.....	162
References.....	164
Chapitre 6 - Discussion générale.....	208
6.1 Modulation de la réplication virale dans les cellules co-infectées PCV2b/VSRRP et PCV2b/VIP	209
6.2 Impact de la co-infection PCV2b/VSRRP et PCV2b/VIP sur la viabilité cellulaire et l'expression des ARNm de certaines cytokines.....	211
6.3 Modulation différentielle de l'expression des gènes et des voies de signalisation cellulaires dans les cellules co-infectées par rapport aux cellules mono-infectées	217
6.4 Rôle du gène DUSP1 dans la co-infection PCV2b/VSRRP.....	221
6.5 Limites et perspectives.....	225
Chapitre 7 - Conclusions générales	228
Références bibliographiques.....	229
Annexes	287

Liste des tableaux

Chapitre 2 - Revue de littérature

Tableau 1. Fonctions et caractéristiques connues des protéines codées par les ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5 et ORF6 du PCV.33

Tableau 2. Fonctions et caractéristiques connues des protéines structurales et non structurales du VSRRP.....47

Tableau 3. Caractéristiques des récepteurs du VSRRP.....50

Tableau 4. Caractéristiques et fonctions des protéines du virus de l'influenza type A62

Chapitre 5 - Résultats

Premier article. DUSP1 mRNA modulation during porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-infection regulates viruses replication

Supplemental table S1. List of primers and probes used for PCV2b and PRRSV genome quantification, and for cytokines mRNA relative expression quantification in NPTr-CD163 infected cells.....132

Supplemental table S2. Differentially expressed genes in PCV2b-, PRRSV- and PCV2b/PRRSV-infected NPTr-CD163 cells.....133

Supplemental table S3. Distribution of differentially expressed genes (DEGs) in infected NPTr-CD163 cells according to the Venn diagram illustrated results139

Deuxième article. Porcine circovirus modulates swine influenza virus replication in pig tracheal epithelial cells and porcine alveolar macrophages

Supplemental table S1. List of primers and probe used for PCV2b quantification and primers used in RT-qPCR for cytokines mRNA quantification in NPTr and iPAM 3D4/21 cells178

Supplemental table S2. Up-regulated genes in NPTr cells.....179

Supplemental table S3. Down-regulated genes in NPTr cells186

Supplemental table S4. Up-regulated genes in iPAM 3D4/21 cells198

Supplemental table S5. Down-regulated genes in iPAM 3D4/21 cells204

Liste des figures

Chapitre 2 - Revue de littérature

Figure 1. Résumé des mécanismes et des résultats possibles des infections virales et bactériennes des voies respiratoires porcines.....	28
Figure 2. Représentation schématique du virion du PCV avec illustration du génome d'ADN circulaire simple brin.....	31
Figure 3. Représentation schématique du génome du PCV 2.....	32
Figure 4. Modèle du cycle de réplication du PCV.....	35
Figure 5. Mécanisme de réplication de l'ADN viral de PCV par « rolling-circle ».....	36
Figure 6. Représentation schématique du virion du VSRRP avec l'ARN simple brin (sb) et les protéines structurales le composant.....	44
Figure 7. Organisation génomique du VSRRP et son réseau d'ARN sous-génomiques.....	46
Figure 8. Cycle de réplication du VSRRP.....	52
Figure 9. Représentation schématique d'un virion Influenza A montrant les protéines et ribonucléoprotéines virales.....	61
Figure 10. Cycle de réplication du virus de l'influenza A.....	65
Figure 11. Dérive génétique et réassortiment génétique du virus influenza A.....	69
Figure 12. Activation de la réponse interféron déclenchée par la détection de motifs moléculaires associés à des pathogènes viraux.....	82

Chapitre 5 - Résultats

Premier article. DUSP1 mRNA modulation during porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-infection regulates viruses replication

Figure 1. PCV2b and PRRSV can infect and co-localized in NPTr-CD163 cells.....	107
Figure 2. PCV2b/PRRSV co-infection modulates viral replication in NPTr-CD163 cells.....	108
Figure 3. PCV2b and PRRSV decrease cell viability on co-infected and PCV2b single-infected cells.....	109

Figure 4. PCV2b and PRRSV co-infection modulates cytokines mRNA expression in NPTr-CD163 cells.....	110
Figure 5. PCV2b and PRRSV modulates gene expression and biological process in single-infected and co-infected cells.	111
Figure 6. <i>DUSP1</i> expression was differentially modulated in PCV2b and PRRSV single-infected and co-infected NPTr-CD163 cells.....	112
Figure 7. DsiRNAs targeting swine <i>DUSP1</i> decrease gene and protein expression in PCV2b/PRRSV co-infected NPTr-CD163 cells.....	114
Figure 8. Transiently knockdown of <i>DUSP1</i> influenced viral replication in PCV2b/PRRSV-infected NPTr-CD163 cells.	115
Figure 9. Protein network analysis with the DEGs identified in PCV2b/PRRSV co-infected cells.	116
Supplemental figure S1: Protein network analysis with the DEGs identified in PCV2b and PRRSV single infected cells.	130
Supplemental figure S2. DsiRNAs targeted <i>DUSP1</i> does not impact cell viability.	131
Deuxième article. Porcine circovirus modulates swine influenza virus replication in pig tracheal epithelial cells and porcine alveolar macrophages	
Figure 1. PCV2b and SwIV H1N1 co-localization in both NPTr and iPAM 3D4/21 co-infected cells.	148
Figure 2. PCV2b co-infection effects on SwIV replication in infected NPTr and iPAM 3D4/21 cells.	149
Figure 3. SwIV co-infection effects on PCV2b replication in infected NPTr and iPAM 3D4/21 cells.	150
Figure 4. Cell viability assay.....	151
Figure 5. PCV2b/SwIV co-infection effects on the modulation of cytokines' mRNA expression.	152
Figure 6. Venn diagram of differentially expressed genes (DEGs) in PCV2b/SwIV co-infected cells.	154

Figure 7. KEGG pathway enrichment analysis of the DEGs identified in single-infected and co-infected cells.....	156
Supplemental figure S1. Immunofluorescence assay performed on NPTr and iPAM 3D4/21 mock-infected cells.....	175
Supplemental figure S2. Protein-protein interaction networks and associated cellular pathways on PCV2b/swH1N1 co-infected NPTr cells.....	176
Supplemental figure S3. Protein-protein interaction networks and associated cellular pathways on PCV2b/swH1N1 co-infected iPAM 3D4/21 cells.....	177

Chapitre 6 - Discussion générale

Figure 1. Pourcentage de gènes différentiellement exprimés (DEGs) impliqués dans différents systèmes biologiques (selon KEGG), dans les cellules infectées avec PCV2b, VSRRP et PCV2b/VSRRP, comparativement aux cellules non-infectées.	218
--	-----

Figure 2. Positions approximatives des sous-unités de TRAP et association du translocon avec le ribosome.....	223
--	-----

Annexes

Figure 1. Les profils du Bioanalyzer pour chacun des échantillons d'ARN purifiés à partir de cellules NPTr-CD163 infectées par PCV2b, VSRRP et PCV2b/VSRRP.	287
---	-----

Figure 2. Les profils du Bioanalyzer pour chacun des échantillons d'ARN purifiés à partir de cellules NPTr et iPAM 3D4/21 infectées par PCV2b, VIP et PCV2b/VIP H1N1.....	288
--	-----

Figure 3. Volcano plots montrant la distribution des gènes différentiellement exprimés (DEGs) identifiés dans les cellules NPTr-CD163 infectées par PCV2b, VSRRP et PCV2b/VSRRP.....	289
---	-----

Figure 4. Volcano plots montrant la distribution des gènes différentiellement exprimés (DEGs) identifiés dans les cellules NPTr infectées par PCV2b, VIP H1N1 et PCV2b/VIP H1N1.	290
--	-----

Figure 5. Volcano plots montrant la distribution des gènes différentiellement exprimés (DEGs) identifiés dans les cellules iPAM 3D4/21 infectées par PCV2b, VIP H1N1 et PCV2b/VIP H1N1..	290
---	-----

Liste des sigles et abréviations

A(H1N1)pdm09	Virus de la grippe pandémique
aa	Acide aminé
ADE	Antibody-dependant enhancement (Facilitation de l'infection par des anticorps)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	ARN complémentaire
ARNss	ARN simple brin
ARNds	ARN double brin
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNsg	ARN sous-génomiques
APAF-1	Apoptotic protease activating factor-1 (Facteur 1 d'activation de la protéase apoptotique)
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1 (Kinase régulatrice du signal de l'apoptose 1)
BAL	Bronchoalveolar lavage (Lavage bronchoalvéolaire)
BHK-21	Baby Hamster Kidney Fibroblast Cells (Cellules rénales de hamster nouveau-né)
CHO	Chinese hamster ovary cell (Lignée cellulaire issue d'ovaires de hamster de Chine)
CL2621	African green monkey kidney derivative of MA-104 (Lignée cellulaire dérivée des cellules MA-104, dérivée du rein du singe vert d'Afrique)

Cos-7	African green monkey SV40-transfected kidney cells (Lignée cellulaire dérivée du rein du singe vert d'Afrique transfectées avec SV40)
CREB	cAMP response element-binding protein (Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc)
CRP	Complexe des maladies respiratoires porcines
cRNP	Ribonucléoprotéine complémentaire
DEGs	Differentially expressed genes (Gènes différenciellement exprimés)
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animals (Différenciation des animaux infectés des animaux vaccinés)
DMVs	Double-membrane vesicles (Vésicules à double membrane)
DUSP	Dual specificity phosphatase (Phosphatase à double spécificité)
ER	Endoplasmic reticulum (Réticulum endoplasmique)
ERK	Extracellular signal-regulated kinases (kinases régulées par les signaux extracellulaires)
ERS	Endoplasmic Reticulum Stress (Stress du réticulum endoplasmique)
FAK	Focal adhesion kinase (Kinase d'adhésion focale)
FOX	Abréviation de Forkhead box
GO	Gene ontology (Ontologie des gènes)
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase-3 beta
hpi	Heures post-infection
Hsp	Heat shock protein (Protéine de choc thermique)
iPAM	Immortalized porcine alveolar macrophage (Macrophage alvéolaire porcin immortalisé)
ISGs	Interferon-stimulated genes (Gènes stimulés par l'interféron)
IV	Inactivated vaccine (Vaccin inactivé)

JAK/STAT	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (Janus kinase/transducteur de signal et activateur des voies de transcription)
KV	Killed vaccine (Vaccin tué)
MA-104	African green monkey kidney cells (Lignée cellulaire dérivée du rein du singe vert d'Afrique)
MACVP	Maladie associée au circovirus porcin
MAPK	Mitogen-activated protein kinases (Voies de signalisation de protéines kinases activées par des agents mitogènes)
MARC-145	African green monkey kidney derivative of MA-104 (Lignée cellulaire dérivée des cellules MA-104, dérivée du rein du singe vert d'Afrique)
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein (Protéine de signalisation antivirale mitochondriale)
MDM 2	Murine double minute 2 gene (Gène murin double minute 2)
MLV	Modified Live Virus Vaccines (Vaccins vivants modifiés)
MMP	Matrix metalloproteinases (Métalloprotéinase matricielle)
MRC-5	Lignée de cellules de type fibroblastes embryonnaires humains
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B (Voie de signalisation de facteurs nucléaires améliorateurs de chaîne légère kappa de cellules B activées)
NLFK	Feline kidney (Cellules rénales félines)
NLR	NOD-like receptors (Récepteurs de type NOD)
NLRP3	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain, Leucine Rich Repeat And Pyrin Domain Containing 3 (Domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides, répétition riche en leucine et domaine pyrine contenant la protéine 3)
NLS	Nuclear localization signal (Signal de localisation nucléaire)
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain (Domaine d'oligomérisation se liant aux nucléotides)

NPTr	Newborn piglet tracheal epithelial cell line (Lignée cellulaire de la trachée de porcelets nouveau-nés)
NSP	Nonstructural protein (Protéine non structurale)
OAS	2'-5'-oligoadenylate synthetase (2'-5'-oligoadénylate synthétase)
ORF	Open reading frame (Cadres de lecture ouverts)
PAM	Porcin alveolar macrophages (Macrophages alvéolaires porcins)
pAPN	Porcine amino peptidase N (Aminopeptidase N porcine)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (Cellules mononuclées du sang périphérique)
PCLS	Precision cut lung slices (Tranches de poumon découpées avec précision)
PCV2	Porcin circovirus type 2 (Circovirus porcine de type 2)
PCV2b/VSRRP	Co-infection avec le PCV2b et le VSRRP
PCV2b/VIP	Co-infection avec le PCV2b et le VIP
PDNS	Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (Syndrome de néphropathie et dermatite porcine)
PEARS	Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (Syndrome abortif et respiratoire épidémique du porc)
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase (Kinase du réticulum endoplasmique de type PKR)
PI3K/AKT	Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) /protéine kinase B (PKB plus connu sous le terme AKT)
PK 032495	Porcine kidney cells (Cellules de rein de porc)
PK-15	Porcine kidney cells (Lignée cellulaire continue de rein de porc)
PKR	Protein kinase R (Protéine kinase R)

PRRs	Pattern recognition receptors (Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires)
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin)
PRV	Pseudorabies virus (Virus de la maladie d'Aujeszky ou de la pseudorage)
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I (Gène I inductible par l'acide rétinoïque)
RLRs	RIG-I-like receptors (Récepteurs de type RIG-I)
RNP	Ribonucleoproteine
ROS	Reactive Oxygen Species (Espèce réactive de l'oxygène)
RT-qPCR	Reverse transcription- quantitative polymerase chain reaction (Transcription inverse-réaction en chaîne par polymérase quantitative)
RTC	Replication-transcription complex (Complexe de réplication et de transcription)
SDNP	Syndrome de dermatite et néphropathie porcin
SDPS	Syndrome de dépérissement en post-sevrage
SJPL	St-Jude porcine lung cells (Cellules épithéliales de singe initialement mal identifié comme étant des cellules pulmonaires porcines St-Jude)
SK	Swine kidney (Lignée cellulaire de rein de porc)
SOCS	Suppressor of cytokine signaling (Suppresseur de signalisation des cytokines)
SPF	Specific pathogen free animals (animal exempt d'organismes pathogènes spécifiques)
ST	Swine testis cell (Lignée cellulaire de testicules de porc)
SwIV	Swine influenza virus (Virus de l'influenza porcin)
TGEV	Transmissible gastroenteritis coronavirus (Coronavirus de la gastro-entérite transmissible)
TLR	Toll-like receptors (Récepteurs de type Toll)

TNF	Tumor-necrosis factor (Facteur de nécrose tumorale alpha)
TNFR	Tumor necrosis factor receptor (Recepteur du facteur de nécrose tumorale)
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Ligand induisant l'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale)
TRAP	Transmembrane translocon-associated protein complex (Complexe protéique associé au translocon)
trH3N2	virus H3N2 triple réassorti (humain-porc-aviaire)
UMI	Unique Molecular Identifier (identificateurs moléculaires uniques)
UPR	Unfolded Protein Response (Réponse aux protéines non repliées)
VERO	African green monkey kidney cell (Lignée cellulaire dérivée du rein du singe vert d'Afrique)
VIP	Virus de l'influenza porcin
VSRRP	Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin
VVI	Virus-virus interactions (Interactions virus-virus)
WOAH	World Organisation for Animal Health (Organisation mondiale de la santé animale)

*À mima, qui est et sera toujours avec moi,
et à mes trésors Marla Paola et Oliver, ma raison de vivre.*

Remerciements

J'aimerais remercier tous les membres de mon laboratoire, passés et présents, qui ont contribué à la réalisation de ce projet; particulièrement, Dre Chantale Provost, pour le partage de ses connaissances scientifiques, son encouragement et sa critique constructive. Son aide et ses conseils m'ont permis de surmonter les défis auxquels j'ai été confrontée en tant que parent- étudiante, Dr Gagnon, pour l'opportunité de poursuivre mes études dans son laboratoire ainsi que pour le support financier, Christian Lalonde, pour sa gentillesse et ses encouragements et Marie-Jeanne Pesant, pour son aide, sa bonne humeur et son altruisme, sa présence a marqué un avant et un après dans mes années d'études.

J'aimerais remercier ma famille pour son amour infini. Un gros merci à mes enfants, mon conjoint et ma chienne Pirula, ils sont mon plus grand trésor, la force qui me poussait à continuer quand la route me semblait très longue ou que la charge était très lourde.

Je remercie aussi le soutien que j'ai reçu de mes amis, en particulier de Yaindrys Rodriguez, Maria Zardon, Laura Sanchez et Camila Valle. Merci pour vos mots d'encouragement et pour votre confiance en moi. Yaindrys Rodriguez, merci d'être toujours là, dans les moments les plus heureux et les plus difficiles, merci pour ton soutien émotionnel et moral, merci d'être ma sœur de cœur.

J'aimerais remercier les membres de mon Comité Conseil, le Dr Levon Abrahamyan et le Dr David Silversides, pour leurs conseils, ainsi que le Centre de recherche en infectiologie porcine et aviaire (CRIPA) et le Groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale (GREMIP) pour leur soutien à la recherche, et leur encadrement des étudiants. Une mention particulière à Dre Josée Harel, pour ses conseils qui ont tellement contribué à ma formation. Je tiens aussi à remercier le personnel de soutien et administratif de la Faculté de médecine vétérinaire, particulièrement, mesdames Bisailon, Blondin, Crost, Flibotte et Boucher.

Finalement, je remercie le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT), le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), le CRIPA, le GREMIP et l'Université de Montréal, pour les bourses d'études qu'ils m'ont accordées.

Chapitre 1 - Introduction

Le complexe respiratoire porcin (CRP) représente un problème sanitaire majeur dans les élevages de porcs et entraîne de lourdes pertes économiques à la filière porcine mondiale [1]. Le CRP comprend l'association de plusieurs pathogènes, incluant des virus comme le circovirus porcin de type 2 (PCV2), le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) ou le virus de l'influenza porcine (VIP) et des bactéries comme *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, entre autres [1-3]. La gestion de l'élevage et de l'environnement (la température, la ventilation et la qualité de l'air) est aussi un facteur impliqué dans le CRP [1].

Les co-infections virales sont fréquentes dans le CRP [1, 4]. Les processus de synergie ou d'interférence entre les différents virus infectant un même animal peuvent moduler la pathogenèse virale et la réponse de l'hôte envers l'infection [4-10]. Ces interactions peuvent avoir un impact sur l'effet des traitements préventifs et prophylactiques (vaccins, antibiotiques), ce qui complique le contrôle des pathogènes respiratoires porcins.

Le PCV2 est l'un des virus le plus fréquemment identifié dans le CRP [1]. Il est l'agent étiologique du syndrome de dépérissement en post-sevrage (SDPS) [11], une maladie porcine initialement identifiée au Canada en 1991, mais qui a été identifiée rapidement dans tous les principaux pays producteurs de porcs, dans différents continents tels que l'Europe, les Amériques et l'Asie [11]. Le PCV2 a également été associé à plusieurs syndromes tels que le syndrome de néphropathie et dermatite porcine (PDNS), le CRP, des échecs de la reproduction, l'entérite granulomateuse, la lymphadénite nécrosante et l'épidermite exsudative [12, 13]. La terminologie « maladie associée au circovirus porcin (MACVP) » est bien acceptée pour désigner l'ensemble de ces syndromes. Une étude sur l'impact économique de la MACVP dans l'industrie porcine canadienne et nord-américaine a estimé les pertes économiques directes à 560 millions de dollars entre 2004 à 2009 [14].

La grande majorité des infections causées par le PCV2 sont sous-cliniques, et seule une faible proportion de porcs infectés par le PCV2 développe des signes cliniques de la maladie [15]. De nombreuses études ont montré que, même si le PCV2 est un composant nécessaire à la

présentation du syndrome, la présence de co-facteurs, dont la co-infection par d'autres agents pathogènes, est nécessaire pour induire la MACVP [13, 16]. Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) et le virus de l'influenza porcine (VIP) type A sont deux pathogènes souvent présents dans le CRP en concomitance avec le PCV2 [12, 17-24]. Le VSRRP provoque le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP), qui est considéré comme l'une des maladies les plus importantes en production porcine [25-27]. Cette maladie coûte, par année, 35 millions de dollars aux producteurs et près de 20 millions de dollars à la Financière agricole du Québec [28]. La grippe porcine, dont l'agent étiologique est le VIP de type A, est une autre maladie à prévalence élevée dans les troupeaux porcins. L'infection par ce virus provoque normalement une morbidité élevée (jusqu'à 100 %) et une faible mortalité chez les porcs infectés, cependant, une mortalité de 10 à 15% a été rapportée [29]. La présence de différentes souches de virus de l'influenza chez le porc réduit l'efficacité des vaccins commerciaux [30] et provoque des grandes pertes économiques dans l'ensemble de la chaîne de production des porcs (porcelets, porcs en croissance et truies) au Québec [28].

Des infections mixtes par le PCV2 et le VSRRP ou le PCV2 et le VIP ont été fréquemment rapportées, avec des implications multiples [12, 17, 18, 31]. Plusieurs études ont montré que le VSRRP peut compliquer l'infection par le PCV2 et aggraver les signes cliniques liés au MACVP [6-9].

Les infections mixtes avec le PCV2 et le VIP sont également fréquentes chez les porcs [4, 18], mais très peu d'étude existe concernant l'effet de cette co-infection. Une étude, réalisée chez des porcs inoculés expérimentalement avec du PCV2 seul ou en combinaison avec du VIP, a montré que la réplication du PCV2 et les signes cliniques qui lui sont associés ne sont pas modulés en présence de VIP mais que l'infection au PCV2 augmenterait la maladie clinique liée au VIP [10]. Il est connu que le PCV ainsi que le VIP peuvent infecter les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires des voies respiratoires porcines [32-36]. L'étude réalisée par Delgado-Ortega en 2014 a montré des différences significatives dans l'expression de l'ARNm de l'interféron de type III, selon le type de cellule infectée par le VIP de sous-type H3N2 [37]. Les modèles cellulaires inclus dans l'étude susmentionnée étaient: la lignée des cellules de trachée de porc nouveau-né NPTr, des macrophages alvéolaires et des tranches pulmonaires coupées avec précision) [37].

Cependant, à ce jour, l'effet de la co-infection PCV2b/VIP selon le type de cellule infectée demeure inconnu.

L'infection du PCV2 avec d'autres agents pathogènes entraîne une immunosuppression accrue, une inflammation et une aggravation des signes cliniques chez les animaux [12, 16, 38-42]. Les co-infections PCV2/VSRRP et PCV2/VIP entraînent particulièrement de lourdes pertes économiques pour les producteurs, car elles sont associées à une augmentation des infections secondaires, à une maladie respiratoire plus sévère, à un gain de poids quotidien plus faible et à des échecs de la vaccination [6, 10, 43-45].

L'étude de la pathogenèse virale dans le contexte des co-infections permet de mieux comprendre les interactions virus-virus et virus-hôte dans des conditions qui reflètent mieux la réalité. L'élucidation des mécanismes moléculaires à l'origine de la modulation de la réplication et de la pathogenèse virale au cours d'infections mixtes pourrait mener à de nouvelles découvertes qui permettrait, éventuellement, d'améliorer les stratégies de contrôle et de traitement des maladies infectieuses virales porcines.

Le chapitre suivant, revue de la littérature, présente tout d'abord, l'état des connaissances sur les infections mixtes, bactériennes et virales, dans le cadre du CRP. Ensuite, les caractéristiques, la pathogenèse, l'épidémiologie et le contrôle des virus qui font l'objet d'étude de cette thèse, à savoir, le PCV, le VSRRP et le VIP, sont présentés. De plus, l'état des connaissances sur les effets des co-infections PCV2/VSRRP et PCV2/VIP est passé en revue. Enfin, les différents types d'interactions virus-virus et virus - cellule hôte sont abordés ainsi que les mécanismes par lesquels le PCV2, le VSRRP et le VIP peuvent moduler les voies cellulaires pour favoriser leur réplication.

Chapitre 2 - Revue de littérature

2.1 Le complexe respiratoire porcin

Le CRP entraîne des pertes économiques importantes pour l'industrie porcine au niveau mondial [1]. Il se caractérise par une croissance lente chez les animaux atteints, avec une diminution de l'efficacité alimentaire, une léthargie, une anorexie, de la fièvre, de la toux et une dyspnée chez les animaux malades [1, 46]. Le CRP dépend de multiples agents pathogènes, tant viraux que bactériens, qui interagissent entre eux ainsi que de facteurs de l'environnement et de gestion de l'élevage [1].

Plusieurs études ont démontré que la présence simultanée d'au moins deux agents pathogènes chez des porcs présentant des signes cliniques du CRP en élevage ou des lésions pulmonaires à l'abattoir était fréquente [4, 47]. Il a été rapporté que les agents pathogènes prédominants du CRP peuvent varier considérablement selon les sites de production, le type d'échantillon et la méthode d'échantillonnage [1, 48].

Dans une analyse rétrospective des agents étiologiques associés aux maladies respiratoires chez les porcs aux États-Unis, les agents infectieux les plus fréquemment identifiés étaient le VSRRP (35,4 %), *Pasteurella multocida* (31,6 %), *Mycoplasma hyopneumoniae* (27,0 %), le VIP (22,2 %), *Haemophilus parasuis* (22,0 %), le PCV2 (18,6 %), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (18,2 %), *Bordetella bronchiseptica* (8,0 %) et le coronavirus respiratoire porcin (1,5 %) [2]. Dans 88,2 % des échantillons analysés, les auteurs ont identifié au moins deux agents infectieux. Le VSRRP a principalement été détecté en co-infection avec *P. multocida*, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis* et PCV2, dans cet ordre, tandis que le VIP a principalement été trouvé en co-infection avec *P. multocida*, *M. hyopneumoniae*, VSRRP et PCV2, dans cet ordre [2].

Une enquête réalisée en Corée sur 172 porcs, dont 140 porcs présentaient des signes cliniques d'infection respiratoire, a montré que 19,8%, 15,1% et 45,9 % des cas étaient positifs pour le VSRRP, le PCV2 ou les deux virus simultanément, respectivement. Dans la même étude, des bactéries ont été isolées à partir des échantillons positifs au virus. Les bactéries les plus fréquemment isolées étaient *Streptococcus suis* (25,2 %), *M. hyopneumoniae* (20,1 %), *P.*

multocida (12,9 %), *A. pleuropneumoniae* (5,0 %) et, moins fréquemment, *Salmonella spp.* et *B. bronchiseptica* [3].

Il est important de souligner que plusieurs des agents pathogènes liés aux maladies respiratoires des porcs peuvent également être retrouvés chez les porcs en bonne santé ou d'apparence asymptomatique. Une étude réalisée pour déterminer la prévalence des agents pathogènes couramment associés au CRP chez les porcs cliniquement sains a montré des taux de détection de 59,9%, 27,2%, 52,3%, 33,2% et 0,4% pour PCV2, VSRRP, *S. suis*, *H. parasuis* et *A. pleuropneumoniae*, respectivement. Des taux de co-infection de 21,6 % et 6,2 % ont été rapportés respectivement pour PCV2/*S. suis*/*H. parasuis* et VSRRP/PCV2/*S. suis*, dans cette étude [49].

2.1.2 Effets des co-infections dans le complexe respiratoire porcin

Les co-infections par plusieurs pathogènes jouent un rôle important dans le CRP [4]. Les effets des co-infections *in vitro* et *in vivo* peuvent varier en fonction des combinaisons d'agents pathogènes présents et de l'ordre d'infection (séquences des infections mixtes) [50, 51]. Les interactions des agents infectieux lors des infections mixtes du tractus respiratoire porcin peuvent causer l'endommagement de l'appareil mucociliaire des tissus respiratoires favorisant une colonisation bactérienne [4, 52, 53] (Figure 1). Ces interactions peuvent également induire une immunosuppression [4, 54, 55] modifier l'expression des cytokines pro-inflammatoires et de la réponse antivirale [4, 55-57] ou affecter la fonction des macrophages [4, 58-61]. De nombreuses études corroborent qu'une aggravation des signes cliniques est globalement observée lors de co-infections comparativement aux mono-infections [4, 6, 9, 10, 44, 50].

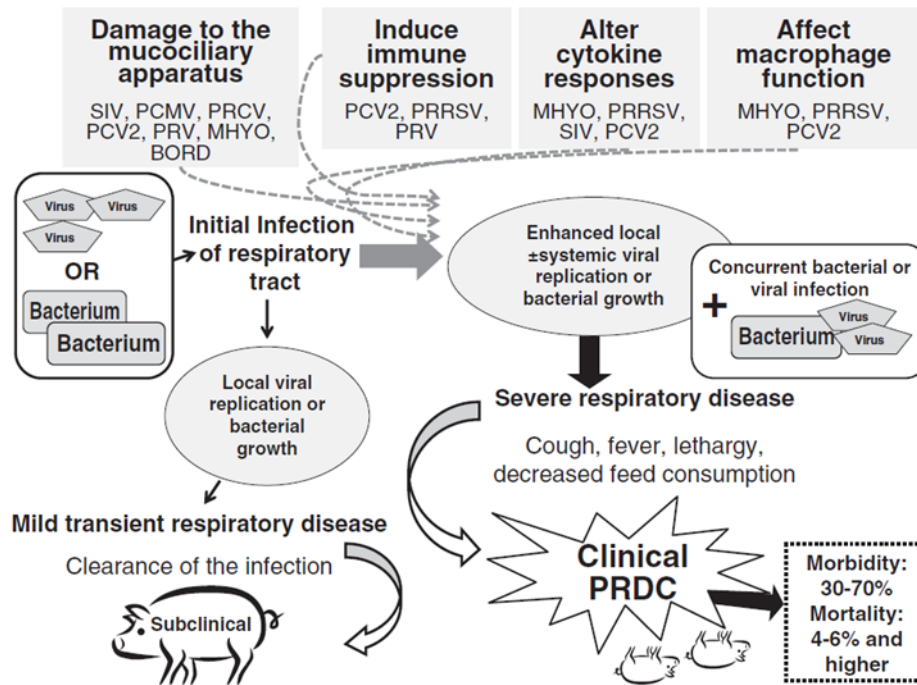


Figure 1. – Résumé des mécanismes et des résultats possibles des infections virales et bactériennes des voies respiratoires porcines. Tiré de [4]. © Cambridge University Press 2011.

Le PCV2, le VSRRP et le VIP se trouvent parmi les principaux pathogènes fréquemment identifiés dans le CRP. Ces virus constituent l’objet d’étude de cette thèse. Dans les sections suivantes les principales caractéristiques de ces virus seront présentées.

2.2 CIRCOVIRUS PORCIN (PCV)

2.2.1 Aspects historiques

Le circovirus porcin (PCV) a initialement été découvert en tant que contaminant de la lignée cellulaire continue de rein de porc PK-15 (ATCC-CCL31) en 1974. À l'époque, il était décrit comme un virus de morphologie similaire au picornavirus [79]. Des infections expérimentales ont démontré que ce virus n'était pas pathogène [62, 63].

En 1991, une nouvelle maladie a été décrite chez des porcs présentant des signes de dépérissement, de jaunisse, de complications respiratoires et de déplétion lymphoïde dans l'Ouest canadien [64-66] et le nom de syndrome de dépérissement post-sevrage (SDPS) lui a été donnée. Ce n'est qu'en 1997 que l'agent étiologique de cette maladie sera identifié comme un variant du circovirus porcin [67, 68]. Afin de distinguer le PCV non-pathogène, du PCV pathogène associé au SDPS, il a été proposé que ceux-ci soient catégorisés comme PCV1 et PCV2, respectivement. Le SDPS a également été officiellement reconnu en Europe, en Espagne et aux États-Unis [69-71].

Bien que la manifestation clinique du SDPS associée au PCV2 ait été signalée pour la première fois au début des années 1990, la présence d'anticorps anti-PCV2 remonte à 1969 en Belgique [72], 1970 au Royaume-Unis [73], 1973 en Irlande [74], 1985 au Canada et en Espagne [75-77], et 1989 au Japon [78]. Le PCV2 est maintenant considéré comme étant omniprésent dans les populations porcines du monde entier [64, 79, 80].

Au Canada, l'émergence en 2005 d'un nouveau génotype de PCV2 a été associée à une augmentation soudaine de mortalité liée au SDPS [81]. Ce nouveau génotype a été nommé PCV2b pour le différencier du premier PCV2, à qui on assigna le nom de PCV2a [11]. En 2009, un nouveau variant chez des porcs sains a été découvert, le PCV1/2a, provenant de la recombinaison génomique du PCV1 et du PCV2a [82]. Une autre hypothèse suggère que cette souche proviendrait d'un vaccin commercial chimère PCV1/2a mal inactivée qui aurait conservé sa capacité infectieuse [82].

2.2.2 Taxonomie

Le PCV appartient au genre *Circovirus* dans la famille *Circoviridae*, laquelle comprend également le genre *Cyclovirus* [83]. Quatre espèces de PCV ont été actuellement reconnues chez les porcs, soit le PCV1, PCV2, le circovirus porcin de type 3 (PCV3) et le circovirus porcin de type 4 (PCV4) [83]. PCV1, PCV2 et PCV3 ont été identifiés dans le monde entier [67, 84-94], alors que le PCV4 n'a été signalé qu'en Chine et Corée du Sud [95-98].

Aujourd'hui, le PCV2 est divisé en huit génotypes (PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d, PCV2e, PCV2f, PCV2g et PCV2h), basés sur des analyses phylogénétiques du génome complet et de la région ORF2 [99]. De plus, des sous-génotypes du PCV2 ont été reconnus sur le terrain. Dans le cas de PCV2a, PCV2b et PCV2d, cinq (2A-E), trois (1A-C) et deux sous-génotypes (2d-1 et 2d-2) ont été identifiés, respectivement [100, 101].

Parmi les génotypes de PCV2, les infections au PCV2a, PCV2b et PCV2d sont les plus associées au développement de maladies chez les porcs [102-110]. Ces génotypes circulent dans les fermes porcines du monde entier [100, 105, 106, 111]. Le PCV2c a été signalé au Danemark, au Brésil et en Chine [112-114]. Le PCV2e a été identifié en Chine, en Corée, aux États-Unis et au Mexique [115-117]. Le PCV2f a été identifié en Chine, en Inde, en Indonésie, au Brésil et en Croatie [118, 119]. Des rapports ont montré que le PCV2g circule en Allemagne, en Roumanie et en Ukraine ainsi qu'en Asie [120] et que le PCV2h circule en Chine, en Inde, en Indonésie, en Thaïlande et au Viet Nam [121].

2.2.3 Caractéristiques du virion, génome et protéines

Le PCV est l'un des plus petits virus connus infectant les animaux. Le virus est non-enveloppé. La capside icosaédrique est assemblée à partir de 60 sous-unités de la protéine de capside Cap [122], formant les principaux antigènes du virus [123].

Le virus contient un génome d'ADN circulaire, simple brin, le tout fermé de manière covalente (Figure 2). La taille du génome est d'environ 1,7 à 2,0 kb (PCV1: 1.7kb, PCV2: 1.7 kb, PCV3: 2.0kb, PCV4: 1.7kb) [84, 98, 124-126].

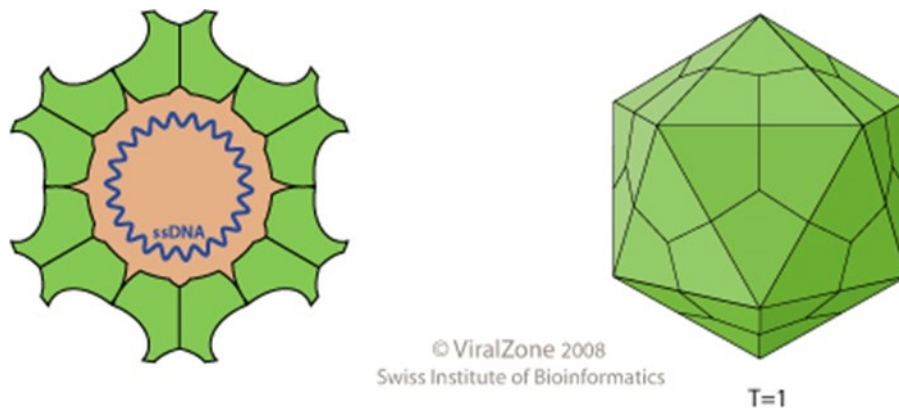


Figure 2. – Représentation schématique du virion du PCV avec illustration du génome d'ADN circulaire simple brin. Tiré de (<http://viralzone.expasy.org>). © ViralZone 2008, Swiss Institute of Bio-informatiques. Permission accordée.

Le génome du PCV1 et du PCV2 partage une similarité de séquence nucléotidique de 68 à 76 % [98, 127]. En ce qui concerne la variabilité intra-génotype, les isolats de PCV1 et de PCV2 conservent respectivement 97%-99% et 94,6%-99% d'identité de séquence [84].

L'ADN génomique de PCV1 et PCV2 contient au moins 11 cadres de lecture ouverts (ORF) (Figure 3). L'ORF1, ORF5, ORF7 et ORF10 sont situés sur le brin positif et sont transcrits dans le sens horaire tandis que l'ORF2, ORF3, ORF4, ORF6, ORF8, ORF9 et ORF11 sont codés par le brin complémentaire (négatif) et sont transcrits dans le sens anti-horaire [128]. Jusqu'à présent,

uniquement trois ORF dans le PCV3 (ORF1, ORF2 et ORF3) et deux ORF dans le PCV4 (ORF1 et ORF2) ont été identifiés [129].

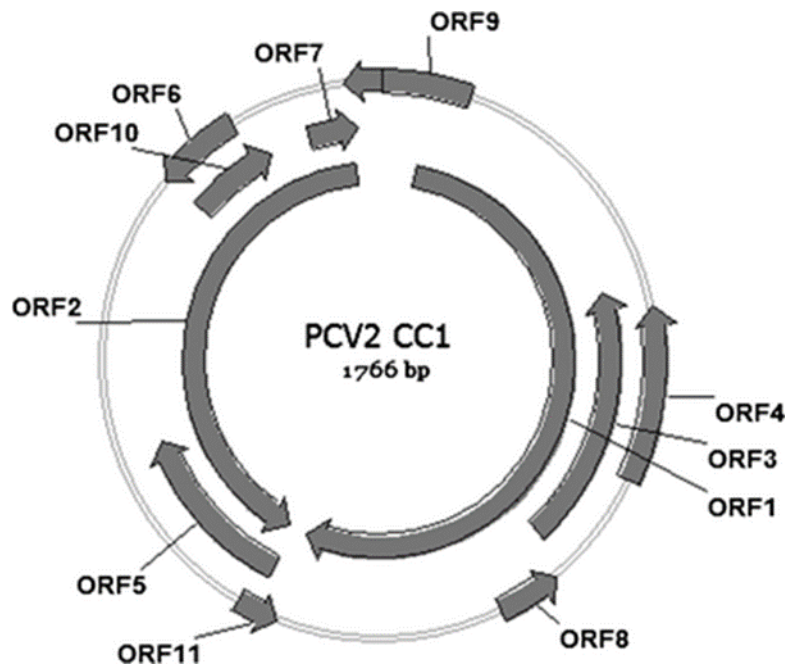


Figure 3. – Représentation schématique du génome du PCV 2. La localisation et le sens des cadres de lectures sont montrés. Tiré de [130]. © 2016, Springer Science Business Media New York. Permission accordée.

Parmi les 11 cadres de lecture ouverts (ORF) identifiés dans le PCV (PCV1 et PCV2), uniquement 6 ORF codent pour des protéines ayant des fonctions connues ou partiellement connues. L'ORF1 code pour les protéines Rep et Rep' tandis que l'ORF2 code pour la protéine Cap [131]. L'ORF4 est situé à l'intérieur et dans la même direction que l'ORF3. Les deux se chevauchent avec l'ORF1. L'ORF5 et l'ORF6 sont orientés dans des directions opposées et se chevauchent avec l'ORF2 [132]. Les caractéristiques et fonctions connues des protéines codées par ces ORF sont décrites dans le Tableau 1.

Tableau 1. – Fonctions et caractéristiques connues des protéines codées par les ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5 et ORF6 du PCV.

ORF	Caractéristiques et fonctions	Références
ORF 1	<p>Code pour les protéines non structurales Rep et Rep' nécessaires à la réplication du génome viral.</p> <p>La protéine Rep est traduite par l'ensemble du transcrit, alors que la protéine Rep' est le produit d'une transcription tronquée de l'ORF1.</p> <p>La taille de la protéine Rep est: PCV1 312 aa, PCV2 314 aa, PCV3 296-297aa, PCV4: 296 aa.</p> <p>La taille de la protéine Rep' est: PCV1: 168 aa, PCV2: 297 aa, PCV3 et PCV4 Inconnu.</p> <p>Il y a 83% d'identité nucléotidique et 86% d'identité en acides aminés entre l'ORF1 de PCV1 et PCV2.</p> <p>Il y a 48% d'identité en acides aminés entre l'ORF1 de PCV2 et PCV3.</p>	[15, 133, 134]
ORF 2	<p>Code pour la protéine de capsid Cap (27,9 kDa) qui est la seule protéine structurale du virus.</p> <p>La taille de la protéine est : PCV1 : 230-233 aa, PCV2 : 233-236 aa, PCV3 : 214 aa, PCV4 : 228 aa.</p> <p>Il y a 67% d'identité nucléotidique et 65% d'identité d'acides aminés entre le ORF2 de PCV1 et PCV2.</p> <p>Il y a 24% et 26% d'identité en acides aminés entre le ORF2 de PCV3 et l'ORF2 de PCV1 et PCV2, respectivement.</p> <p>Déterminant antigénique majeur du virus.</p> <p>Joue un rôle dans la réplication virale.</p> <p>Elle est exprimée 6 à 12 heures post-infection (hpi) et sa relocalisation nucléaire survient entre 12 à 24 hpi dans les cellules PK-15.</p> <p>Elle régule positivement l'expression de l'IL-10 en activant les voies de signalisation PI3K/AKT, p38 MAPK et ERK.</p>	[15, 135-139]
ORF 3	<p>Il y a 60% d'identité en acides aminés entre l'ORF 3 de PCV1 et PCV2.</p> <p>Implication dans l'induction de l'apoptose et la dégradation protéasomale des protéines cellulaires.</p>	[140, 141]

ORF 4	Joue un rôle dans la suppression de l'apoptose, la régulation des lymphocytes CD4+ et CD8+ et la restriction de la transcription de l'ORF3.	[142, 143]
ORF 5	Impliqué dans l'induction de l'autophagie, le stress du réticulum endoplasmique (ERS), la réponse aux protéines non repliées (UPR) et le contournement de la surveillance immunitaire de l'hôte par voie de l'inhibition de la signalisation IFN, améliorant ainsi la réplication du virus.	[144, 145]
ORF 6	Impliqué dans la régulation de l'activité des caspases Influence l'expression des cytokines	[146]

2.2.4 Entrée et réplication virale

Pour se fixer aux cellules hôtes, le PCV2 interagit avec le récepteur de sulfate d'héparane (HS) et/ou le sulfate de chondroïtine B (glycosaminoglycane)[147]. Le virus s'internalise lentement en utilisant différentes méthodes selon le type cellulaire. Dans les PAMs et les cellules dendritiques, le PCV2 entre par endocytose médiée par la clathrine ou macropinocytose [32, 148], tandis qu'il pénètre dans les cellules épithéliales de manière dépendante de l'actine et de la Rho-GTPase [149]. Dans les monocytes primaires et les lymphoblastes T, le virus peut utiliser les deux voies d'internalisation préalablement mentionnées [150, 151]. Dans les cellules PK-15, il a été décrit que l'internalisation du virus peut prendre la voie de la clathrine ou la voie indépendante de la dynamine et du cholestérol [151].

Après l'internalisation, le virus est transporté dans l'endosome-lysosome et la libération de l'endosome est médiée par les protéases à sérines. Le pH influence la décapsidation du PCV2 d'une manière dépendante du type de cellule. Par exemple, dans les PAMs et les lymphoblastes T, la décapsidation du virus nécessite un pH bas [32, 150], alors que dans les lignées cellulaires épithéliales, la décapsidation du virus se fait à un pH neutre [149, 152]. Dans les monocytes, la décapsidation virale est indépendante de la voie médiée par les protéases à sérines, mais l'acidification de l'endosome est nécessaire pour libérer le PCV2 dans le cytoplasme [32]. Toutefois, certaines études ont rapporté que le PCV2 n'est pas capable de procéder à sa décapsidation dans les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques dérivées de monocytes et de la moelle osseuse [151, 153].

La nucléocapside virale interagit avec la phosphoprotéine nucléolaire nucléophosmine-1 (NPM1) grâce au signal de localisation nucléaire (NLS) actif dans la protéine virale Cap, puis elle est transférée au noyau en utilisant les microtubules acétylés et polymérisés [154, 155] (Figure 4).

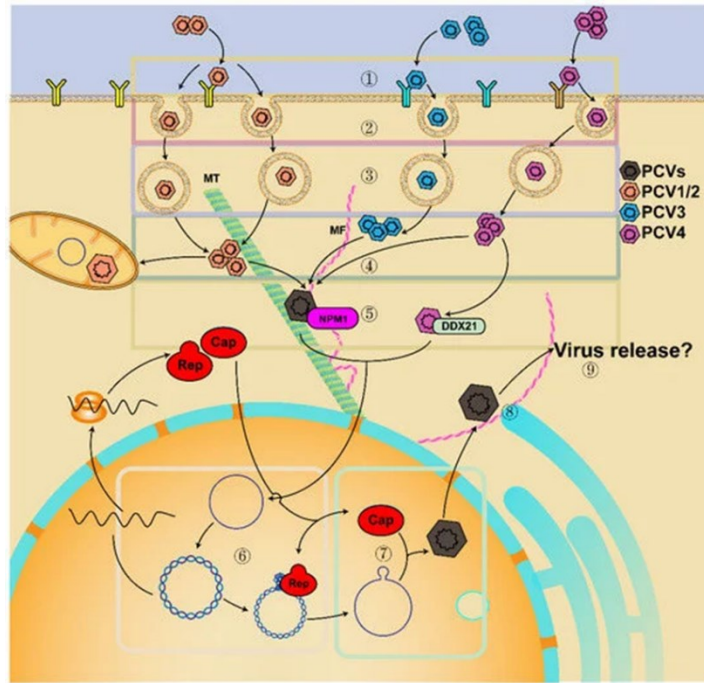


Figure 4. – Modèle du cycle de réplication du PCV.

1) Le PCV se fixe aux récepteurs cellulaires; 2) Le PCV pénètre dans les cellules via une endocytose médiée par la clathrine, une macropinocytose ou de manière dépendante de l'actine et de la Rho-GTPase ; 3) Le PCV est transporté dans l'endosome-lysosome et la décapsidation du virion se fait par la sérine protéase d'une manière dépendante du pH faible ou du pH neutre ; 4) libération de l'endosome dans le cytoplasme d'une manière dépendante du faible pH ; 5) translocation dans le noyau via interaction avec la tubuline, les microtubules (MT), les microfibrilles (MF), NPM1 et DDX21 ; 6) réplication en cercle roulant (rolling-circle) ; 7) la protéine Cap nouvellement synthétisée est transportée dans le noyau pour l'encapsidation et l'assemblage du génome à un pH presque neutre; 8) transport du virion vers le cytoplasme; 9) libération des virions. Tiré de [129]. © Creative Commons. Permission accordée avec mention.

Dans le noyau, le génome viral se réplique par mécanisme de répllication en cercle roulant (rolling-circle) (Figure 5) via le complexe de répllication comprenant Rep et Rep' [156]. Au début, il y a une répllication du simple brin viral qui donne comme résultat l'obtention d'ADN circulaire double brin enroulé (supercoiled). Le complexe de répllication se lie ensuite à une structure en forme de tige-boucle qui constitue le site d'initiation de la répllication. Par la suite, le complexe de répllication va se séparer et libérer une extrémité 3'OH. L'ADN polymérase commence alors la répllication du génome viral pour se terminer lorsque le complexe viral Rep referme le site [157].

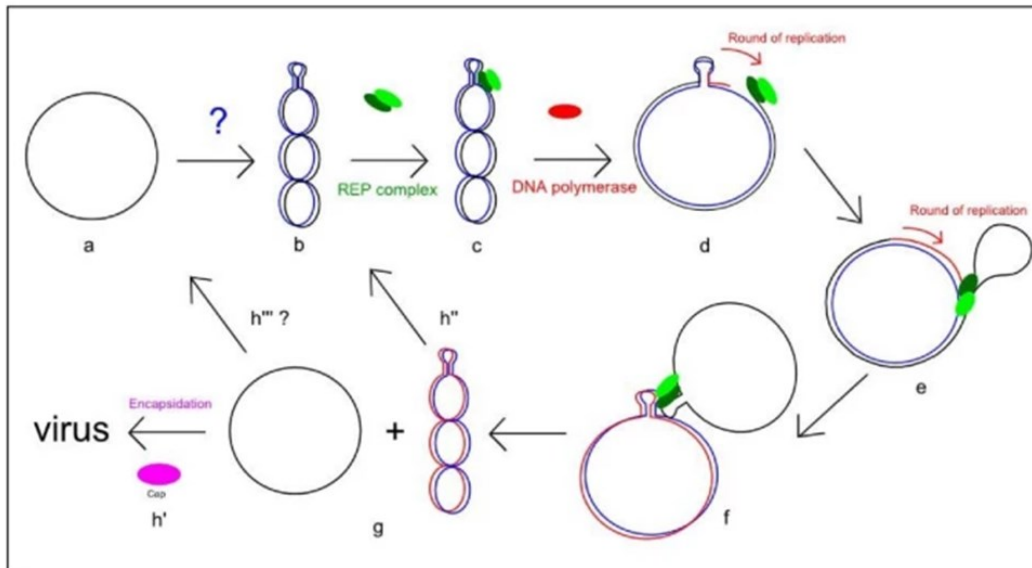


Figure 5. – Mécanisme de répllication de l'ADN viral de PCV par « rolling-circle ».

a) Brin positif du génome viral initial. b) Par un mécanisme encore inconnu, le génome prend une forme en boucle pour produire l'intermédiaire de répllication d'ADN double brin. c et d) Les protéines du complexe Rep sont alors traduites et se lient à la tige-boucle pour permettre la répllication du génome en coupant spécifiquement l'ADN à ce site. d et e) L'ADN polymérase de l'hôte initie la répllication à partir de l'extrémité 3'OH laissée libre alors que le complexe Rep demeure lié à l'extrémité 5' de la tige-boucle. f et g) Après une ronde de répllication, le complexe Rep referme l'ADN et relâche 1 brin d'ADN simple et un brin d'ADN double brin. h', h'' et h'''). L'ADN peut alors être utilisé de nouveau dans un autre cycle de répllication ou être encapsidé. Tiré de [157]. © Creative Commons. Permission accordée avec mention.

La synthèse des protéines Rep et Cap peut être détectée à partir de 12 hpi [150]. La protéine Cap nouvellement synthétisée est transportée vers le noyau, via le NLS, pour l'encapsidation du génome et l'assemblage de virions infectieux à un pH quasi neutre [151, 158]. Finalement, les nouveaux virions sont libérés entre 24 et 36 hpi [150].

2.2.5 Tropisme cellulaire

Il a été démontré que le PCV1 infecte les cellules de type macrophage/monocyte chez des porcs infectés expérimentalement [63]. Le PCV2, quant à lui, peut infecter différents types de cellules *in vivo* telles que les cellules épithéliales, monocytaires et endothéliales [159, 160]. Il a été suggéré que le tropisme du PCV2 est dépendant de l'âge, ce qui a été mis en évidence par le fait que chez les fœtus, le virus a été trouvé dans les cardiomyocytes, les hépatocytes et les cellules de la lignée des monocytes [33], alors qu'après la naissance, le virus cible les lymphoblastes et les macrophages [79, 151]. L'antigène du PCV2 a souvent été identifié dans les tissus lymphoïdes ou dans les zones d'accumulation de cellules inflammatoires [33].

Le PCV3 a été détecté dans les lymphocytes, les cellules épithéliales bronchiques, les cellules réticulaires corticales et médullaires, les macrophages et les éosinophiles sur les noeuds lymphatiques, les cellules épithéliales tubulaires rénales, les hépatocytes et les myocytes cardiaques [161-163].

In vitro, le PCV se multiplie très bien en monocouches semi-confluentes de cellules PK-15, où il n'induit pas d'effet cytopathique [164].

Une étude a démontré, *in vitro*, que le PCV1 infecte également les cellules mononucléaires bovines, mais pas ovines ou humaines [165]. La réplication du PCV1 dans les cellules simiennes (Vero) a été rapportée, mais le passage prolongé de ce virus dans ces cellules entraînerait des changements antigéniques dans le virus [166]. McNeilly F *et al.* (1996) ont montré que l'inoculation *in vitro* de macrophages alvéolaires porcins avec le PCV1 affectait certaines fonctions immunitaires de ces cellules [167].

Plusieurs lignées cellulaires d'origine épithéliale ont été utilisées avec succès pour la propagation du PCV2, y compris la lignée cellulaire PK-15, la lignée cellulaire de testicules de porc (ST), la lignée cellulaire de rein de porc (SK) et la lignée cellulaire de trachée de porc nouveau-né (NPTr) [11,

149, 168, 169]. Les hépatocytes porcins primaires et les cellules rénales porcines ont été utilisées pour propager le PCV1 et le PCV2 [170]. Le PCV3 a pu être isolé dans des cellules rénales porcines primaires [171].

2.2.6 Épidémiologie et pathogenèse virale

2.2.6.1 Épidémiologie

Contrairement au PCV1 qui semble posséder une faible prévalence [94, 172], PCV2 et PCV3 sont très répandus [173-176] et ont été identifiés dans toutes les principales zones de production de porc dans le monde [67, 84-93].

La dynamique des populations de PCV2 a été caractérisée par des vagues périodiques de génotypes émergents (genotype shift) et la circulation des formes recombinantes [177]. Le PCV2a était le génotype le plus répandu chez les porcs malades avant 2000, puis, entre 2003 et 2006, le PCV2a a été remplacé par le PCV2b [11, 173] qui est devenu le génotype prédominant au cours des années subséquentes [11]. Puis, entre 2010 et 2015, le PCV2d a remplacé le PCV2b comme génotype le plus répandu, du moins chez les animaux cliniquement affectés [99, 100, 106]. La sélection naturelle mais aussi la pression vaccinale semble être une force majeure pour l'émergence et la propagation de nouveaux génotypes [177].

La principale voie de transmission naturelle du PCV2 est oro-nasale [173]. Verreault *et al.* (2010) ont trouvé jusqu'à 10 millions de copies de génomes de PCV2 par mètre cube d'air dans les aérosols de fermes porcines [178]. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que, compte tenu de la résistance environnementale du PCV2, le virus pourrait être transporté sur de longues distances. Outre la voie oro-nasale, le virus serait aussi excrété dans l'urine, les selles et le sperme des porcs infectés, ainsi que dans le lait maternel de truies infectées [179-183].

Une morbidité de 4 à 30% (50 à 60% dans certains élevages) et une mortalité de 4% (20% dans certains élevages) ont été rapportées dans les cas des infections par le PCV2 [13].

2.2.6.2 Maladies et signes cliniques

L'infection par le PCV2, le PCV3 ou le PCV4 peut provoquer une maladie sous-clinique légère [184-187] ainsi qu'une maladie clinique. Le PCV2 est associé à plusieurs maladies et syndromes collectivement appelés « Maladie associée au circovirus porcin (MACVP) » [13]. Le MACVP inclut le syndrome de dépérissement post-sevrage (SDPS), le syndrome de dermatite et néphropathie porcin (SDNP), l'insuffisance de la reproduction, le complexe des maladies respiratoires porcines, l'entérite granulomateuse, la lymphadénite nécrosante et l'épidermite exsudative [13].

Les signes cliniques associés au MACVP comprennent la perte de poids, l'hypertrophie des noeuds lymphatiques et la jaunisse. La réplication de PCV2 dans les tissus lymphoïdes induit une atrophie de ce tissu suivi d'un remplacement histiocytaire [188-190]. Certains porcs infectés peuvent également présenter une détresse respiratoire, une pneumonie interstitielle et une bronchiolite avec infiltration mononucléaire dans les poumons [191]. Des échecs de la reproduction ont également été rapportés chez des animaux malades avec présence d'avortements avec des fœtus présentant une myocardite nécrosante et présence de mortinatalités [13, 192]. De la diarrhée a aussi été observée chez les porcs malades [13] et ceux-ci présentent une muqueuse intestinale épaissie avec des noeuds lymphatiques mésentériques élargis et une entérite granulomateuse [211]. Des lésions cutanées rouges à violettes, une néphrite glomérulaire et interstitielle et une vascularite ont été observées chez des animaux atteints de SDNP [212, 213].

La présence du PCV2 est souvent détecté en l'absence de signes cliniques. C'est pour cette raison qu'un diagnostic de SDPS requiert de répondre à trois critères, (1) des signes cliniques caractéristiques (dépérissement, une maladie respiratoire ou perte de poids), (2) des lésions histologiques typiques d'une infection au PCV2 (déplétion lymphocytaire, invasion histiocytaire des follicules dans le tissu lymphoïde, la formation de cellules géantes ou multinucléées dans les nœuds lymphatiques et les tissus pulmonaires) et (3) la détection d'antigènes ou d'acide nucléique du virus associés aux lésions histologiques [205].

Le PCV3, quant à lui, peut induire le SDNP, des troubles respiratoires, de la diarrhée et des échecs de reproduction chez les animaux infectés [179, 214-216]. Ce virus a été également associé à de problèmes cardiaques et d'inflammation multi-systémiques chez les porcs [86]. Le PCV4 a été

associé à une maladie clinique grave impliquant des signes cliniques respiratoires et entériques, et du SDNP [115, 204].

2.2.7 Réponse du système immunitaire dirigée contre le PCV

2.2.7.1 L'immunité innée

Le PCV2 est connu pour moduler la réponse immunitaire, lui permettant de se protéger contre les défenses de l'hôte. Par exemple, des expériences *in vitro* ont montré que le PCV2 provoque une augmentation d'expression d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10 et de TNF- α dans les cellules infectées [193-196]. Chez les porcs infectés au PCV2, une induction d'IFN- γ , d'IL-8 et des chimiokines CCL2, CCL5 et CXCL10 ainsi qu'une inhibition significative d'IFN- α et d'IL-4 dans les nœuds lymphatiques trachéobronchiques ont été observées [197]. D'autres études ont rapporté l'induction d'IL1- β et d'IL-8 dans des cellules mononucléaires récoltées à partir de sang de porc (PBMC) [198] et une augmentation d'IL-10 dans les nœuds lymphatiques mandibulaires, le thymus, la rate et les amygdales [199, 200].

Les rapports sur la modulation de la réponse IFN à la suite d'une infection par le PCV2b sont contradictoires. Wang *et al.* (2022) ont signalé que l'infection par le PCV2 interfère avec l'activation de la voie de signalisation des IFN de type I et inhibe l'expression des ISGs (interferon-stimulated genes) induits par les IFN *in vivo* et *in vitro* [201]. De plus, des études précédentes ont montré une inhibition de l'IFN- α dans les cellules mononucléées du sang périphérique porcin (PBMC) [202] et une inhibition de l'IFN de type I (IFN- α / IFN- β) dans les cellules PK-15 [145, 203] après une infection par PCV2 ou en présence de protéine virale ou d'ADN de PCV2. Gao *et al.* (2014) ont démontré que le PCV2 inhibait de manière significative l'expression de l'ARNm de l'IFN- γ induite par une souche vaccinale du virus de la maladie d'Aujeszky (PRV) chez les PBMC porcins *in vitro* [204]. Inversement, d'autres études *in vitro* ont montré que le PCV2 induit la production d'interféron de type I dans les macrophages alvéolaires porcins [205] et l'IFN- β dans les cellules PK-15 [206].

Ces différences dans la régulation de l'expression de l'IFN type I par le PCV2 peut s'expliquer par la présence dans le génome du virus de motifs CpG ayant à la fois des propriétés inhibitrices et stimulantes de l'IFN- α [207]. Il est suggéré, également, que les éléments viraux du PCV2 peuvent

réguler distinctement la production de cytokines en fonction du type cellulaire infecté et de leur statut d'activation [208, 209].

2.2.7.2 L'immunité adaptative

Les anticorps induits contre le PCV2 sont généralement neutralisants [210]. Selon Fort *et al.* (2010), il semblerait que le PCV2b induit une plus forte réponse humorale que le PCV2a [188, 211]. Lors d'une infection expérimentale avec le PCV2, il a été montré que les IgM apparaissent dès le 7^{ième} jour post-infection et les IgG apparaissent au 21^{ième} jour post-infection [189].

L'induction de l'immunité cellulaire pourrait également jouer un rôle dans la protection contre le PCV2 [190, 191], [212-214]. Elle implique à la fois des populations de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et T CD4+ auxiliaires [215]. Les protéines Cap et Rep sont impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire développée lors de l'infection par le PCV2 [188, 211]. Une altération des anticorps neutralisants et des lymphocytes T a été observée avec des niveaux élevés de réplication virale menant au SDPS. En fait, l'une des manifestations cliniques les plus importantes du SDPS est une déplétion marquée des lymphocytes T et B qui s'étend aussi aux cellules NK [216-218].

2.2.8 Prévention et contrôle

Le contrôle des MACVP inclut différentes stratégies, y compris la vaccination, le contrôle des co-infections par d'autres virus ou bactéries qui peuvent déclencher le MACVP clinique, les bonnes pratiques de gestion d'élevage, la sérothérapie [219], le dépeuplement et le repeuplement. Cette dernière stratégie a des limitations, elle est coûteuse et le statut 'exempt de PCV2' est très rarement pérenne à cause de la recontamination des élevages [220].

Parmi les méthodes mentionnées précédemment, la meilleure stratégie et la plus éprouvée pour contrôler et diminuer les MACVP dans les troupeaux porcins est la vaccination. Plusieurs études ont rapporté que les vaccins commerciaux contre le PCV2 réduisent considérablement la virémie et l'excrétion du virus (nasale et fécale) après l'infection [221], ainsi que les lésions microscopiques dans les tissus lymphoïdes associés à la maladie [222, 223]. Ils améliorent également la croissance et les performances des animaux [224-226].

L'utilité de la vaccination contre le PCV2 pour induire une réponse en anticorps neutralisants et réduire les lésions et la virémie associées au PCV2 a également été démontrée chez les porcs co-infectés par le PCV2 et le VSRRP [222].

Les quatre principaux vaccins commerciaux contre le PCV2 sont basés sur des isolats de PCV2a, cependant une protection croisée a été démontrée contre le PCV2b et le PCV2d [227-229]. Deux de ces vaccins, Circumvent PCV[®] (Intervet) et Ingelvac CircoFLEX[®] (Boehringer), sont des vaccins sous-unitaires (protéine de la capsid virale produite dans un système de baculovirus). Le troisième vaccin, Foster PCV2 (Pfizer), est composé d'un virus recombinant inactivé, possédant l'ORF1 du PCV1 et l'ORF2 du PCV2a. Le quatrième vaccin, Circovac[®] (Merial), est un vaccin développé à partir d'une souche de PCV2a inactivée.

2.3 VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN (VSRRP)

2.3.1 Aspects historiques

En 1987, une nouvelle maladie à l'étiologie inconnue frappait les fermes porcines de la Caroline du Nord, de l'Iowa et du Minnesota, aux États-Unis [230]. Ce syndrome nommé à ce moment « la maladie mystérieuse du porc », se caractérisait par une pneumonie post-sevrage, des avortements, des cas d'infertilité, un ralentissement de la croissance et une baisse de productivité [230]. Un syndrome similaire a par la suite été reconnu en Allemagne et aux Pays-Bas, en 1991 [231].

L'agent étiologique de cette maladie a d'abord été isolé au Pays-Bas en 1991 à l'aide de macrophages alvéolaires porcins et nommé le virus Lelystad (LV), de la ville d'origine où a été faite sa découverte [232]. En 1992, aux États-Unis, le virus a été isolé à l'aide de porcs gnotobiotiques et désigné comme virus VR-2332 de l'American Type Culture Collection (ATCC) [233]. Il a été retrouvé au Canada la même année [234].

Plusieurs noms ont été utilisés pour décrire le syndrome provoqué par ce virus tels que « le syndrome abortif et respiratoire épidémique du porc (porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) », « Seuchenhafter Spätabort der Schweine (Avortement tardif épidémique chez les porcs) », « maladie des oreilles bleues », « syndrome d'infertilité et respiratoire du porc ». Finalement, en 1992, le nom « porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) » a été officiellement adopté [235].

2.3.2 Taxonomie

Le VSRRP fait partie de l'ordre virale *Nidovirales*, de la famille *Arteriviridae*, du genre *Betaarterivirus*, [83]. Deux espèces de VSRRP sont reconnues, *Betaarterivirus suis 1* (le génotype européen ou type I représenté par la souche Lelystad) et *Betaarterivirus suis 2* (le génotype nord-américain ou type II représenté par la souche ATCC VR-2332) [236]. Les deux types diffèrent génétiquement, antigéniquement et cliniquement [237, 238]. Des homologues nucléotidiques de 63%, 55% et 79% ont été rapportés au niveau du génome entier [239], de l'ORF5 et au niveau du gène ORF6 [240], respectivement, entre les virus des deux types.

Le virus du génotype européen, ainsi que d'anticorps dirigés contre ce virus, ont été constaté sur le territoire américain [241, 242]. D'autre part, le génotype nord-américain a été observé en Asie [243] et en Europe [244]. La vaccination commerciale serait à l'origine de l'introduction du génotype nord-américain en Europe [244].

2.3.3 Caractéristiques du virion, génome et protéines

Le VSRRP possède une morphologie pléomorphe, c'est-à-dire, que le virion a une forme sphérique à ovale, avec un diamètre allant d'environ 50 à 65 nm [245].

Des études cryo-tomographiques électroniques ont suggéré que la nucléocapside virale a une forme asymétrique, plutôt qu'isométrique (icosaédrique) comme il était précédemment supposé [246]. La nucléocapside, dont le diamètre est de 20 à 30 nm [247] est entourée d'une membrane lipidique, l'enveloppe, où les protéines structurales sont intégrées [248] (Figure 6).

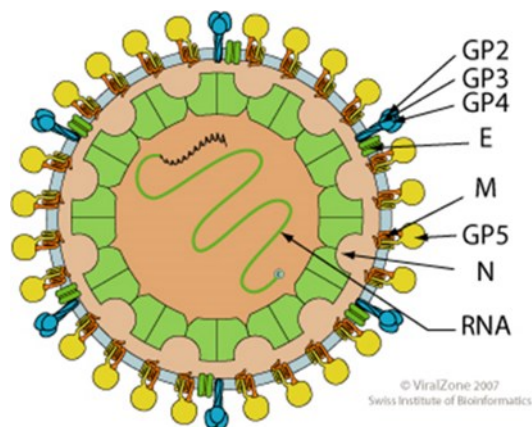


Figure 6. – Représentation schématique du virion du VSRRP avec l'ARN simple brin (sb) et les protéines structurales le composant. Tiré de (<http://viralzone.expasy.org>). © ViralZone 2007, Swiss Institute of Bioinformatics. Permission accordée.

Le VSRRP possède un génome d'ARN simple brin à polarité positive, non segmenté de 15 kb [249, 250]. Les virus ARN possèdent une grande capacité de mutation [251]. Dans le cas du VSRRP des taux de mutations entre $4,71 \times 10^2$ et $9,8 \times 10^2$ /sites synonymes/an ont été rapportés [252-254]. Les mutations ponctuelles seraient le principal mécanisme évolutif du VSRRP, cependant, la recombinaison du génome viral entre les différentes souches de VSRRP pourrait aussi être un mécanisme d'évolution du virus [255-257].

Le génome viral code pour au moins 10 cadres de lecture ouverts (ORF) [258] (Figure 7), qui incluent l'ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6 et ORF7. Les ORFs 1a et 1b représentent environ 75% du génome [259]. Ils sont traduits en poly-protéines (pp1a et pp1b) qui, après clivage, donnent 14 protéines non structurales (Nsp) impliquées en différentes fonctions comme la réplication virale, la transcription et la traduction des ARNm sous-génomiques (sg) et l'inhibition de la réponse immunitaire comme la réduction des IFNs, entre autres (Tableau 2), [258, 260, 261].

Les 8 ORFs restants codent pour les protéines structurales du virus (Figure 7). Elles sont synthétisées à partir d'un ensemble de six ARNm sous-génomiques (ARNm sg) par un processus de synthèse discontinue d'ARN. Tous les ARNm sg sont co-terminaux à l'extrémité 3' et partagent une séquence leader à l'extrémité 5', qui est identique à l'extrémité 5' du génome viral [258, 259, 262, 263].

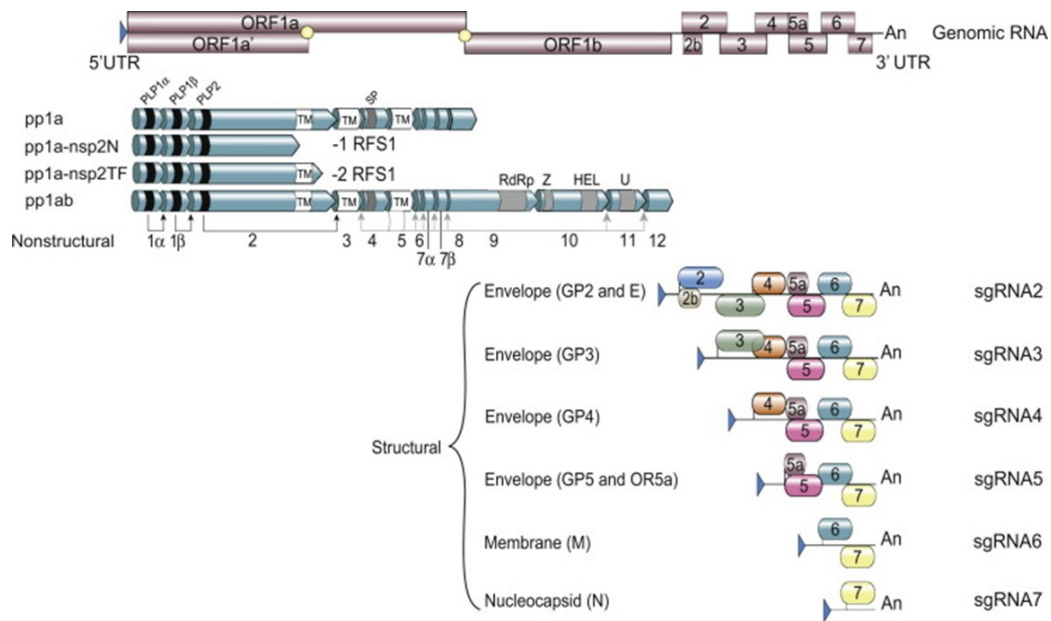


Figure 7. – Organisation génomique du VSRRP et son réseau d'ARN sous-génomiques.

Les polyprotéines pp1a (incluant pp1a-nsp2N et pp1a-nsp2TF) et pp1ab sont traduites directement à partir du génome viral et du même codon de départ grâce à deux sites de changement de cadre de lecture (RFS : ribosomal frameshift). Les 8 protéines structurales sont traduites à partir d'un ensemble de 6 ARN sous-génomiques (sgRNA 2 à 7), nommé selon l'ORF principal traduit à partir de cet ARN. Les ARNsg2 et ARNsg5 servent également à la traduction des ORFs 2b et 5a respectivement. Tiré de [258].

Les protéines structurales du VSRRP sont classées en protéines mineures ou majeures, basées sur leur abondance dans le virion. Les ORFs 2,3 et 4 codent pour les protéines structurales mineures de l'enveloppe : GP2a, GP2b (E), GP3 et GP4. Les ORFs 5, 5a, 6 et 7 codent pour les protéines structurales dites majeures qui incluent les protéines GP5, la protéine ORF5a (p ORF5a), la protéine M de l'enveloppe virale et la protéine N (le seul composant de la nucléocapside virale), respectivement [259, 262, 264].

Il est connu que l'ORF5 est l'une de régions génomiques les plus variables du génome de ce virus [265-272]. C'est le gène le plus utilisé dans les études sur la diversité du VSRRP et pour les analyses phylogénétiques [267, 270, 273-278].

Le tableau suivant résume les principales caractéristiques et fonctions des protéines du VSRRP

Tableau 2. – Fonctions et caractéristiques connues des protéines structurales et non structurales du VSRRP. Adapté de Music et Gagnon, 2010 [261]. ©Cambridge University Press

Protéines	Gènes	Acides aminés (taille)		Fonctions et Caractéristiques	Références	
		VSRRP Type I	VSRRP Type II			
nsp1	ORF1a	385	383	Protéine non structurale régulatrice aux fonctions multiples (biogénèse virale, transcription, traduction); activité protéolytique; inhibition IFN.	[279-283]	
nsp2		861	980			Protéine non structurale, plus grosse protéine de la réplication du VSRRP; Protéine possédant la plus grande variation génétique entre les génotypes NA et EU; marqueur idéal pour l'étude de la variabilité entre les génotypes et dans le développement de tests diagnostiques; activité protéolytique; inhibition IFN.
nsp3		447	446			
nsp4		203	204			
nsp5		170	170			
nsp6		16	16			
nsp7		269	259			
nsp8		45	45			
nsp9	ORF1b	645	640	Protéines non structurales; réplication et transcription virales; nsp9: ARN Polymérase dépendante d'ARN et NTPase; nsp10: hélicase; nsp11: inhibition IFN.	[294-296]	
nsp10		442	441			
nsp11		224	223			
nsp12		152	153			

GP2a	ORF2a	249	256	Protéine structurale mineure; contient 2 sites très conservés théoriques (non confirmés) de N-glycosylation; essentielle pour l'infectivité virale; incorporée dans des virions comme un complexe multimère; protéine d'attachement viral.	[262, 297-300]
E	ORF2b	70	73	Protéine structurale mineure, non glycosylée et myristoylée; essentielle pour l'infectivité du virus; incorporée dans les virions sous forme de complexe multimère; possède des propriétés semblables aux canaux ioniques et pourrait avoir la fonction d'une viroporine dans l'enveloppe.	[297, 301, 302]
GP3	ORF3	265	254	Protéine structurale mineure, une des protéines les plus variables du VSRRP; très glycosylée avec potentiellement 7 oligosaccharides liés à la protéine N (<i>N-linked</i>); sa topologie membranaire varie selon la lignée virale; protéine très antigénique qui pourrait être impliquée dans la neutralisation virale; essentielle pour la capacité infectieuse du virus; Incorporée dans les virions sous forme de complexe multimérique.	[297, 303, 304]
GP4	ORF4	183	178	Protéine structurale mineure très glycosylée (4 sites de glycosylation liés à la protéine N (<i>N-linked</i>)); essentielle à la capacité infectieuse du virus; protéine clé pour la formation du complexe multimérique incorporé dans les virions;	[297-299, 305-307]

				médie l'interaction entre les complexes multimériques des glycoprotéines virales mineures et le GP5; c'est une protéine d'attachement viral qui pourrait être impliquée dans la neutralisation virale.	
GP5	ORF5	201	200	Protéine structurale majeure, transmembranaire, avec un nombre variable de sites de N-glycosylation; protéine du VSRRP la plus variable avec GP3; impliquée dans la neutralisation et la protection; l'association covalente de GP5 et M est cruciale pour l'assemblage viral; Impliquée dans le mécanisme d'entrée virale dans les cellules hôtes et dans le phénomène de l'apoptose.	[262, 304, 308-311]
pORF5a	ORF5a	43	51	Protéine structurale; la structure suggère un rôle dans le clivage et le transport de l'ARN.	[312-315]
M	ORF6	173	174	Protéine structurale majeure non glycosylée qui est la plus conservée; joue un rôle clé dans l'assemblage et le bourgeonnement du virus; l'hétérodimérisation de GP5-M est cruciale pour l'infectivité virale.	[259, 261, 308, 309]
N	ORF7	128	123	Protéine structurale majeure, non glycosylée, phosphorylée; très immunogénique et candidat intéressant pour la détection d'anticorps spécifiques au virus pour le diagnostic. Seule composante de la capsid virale, elle interagit avec elle-même à travers des liens covalents et non-covalents. Elle	[259, 261, 262, 308, 316, 317]

				peut être localisée dans le nucléole/noyau cellulaire et interagir avec les facteurs de transcription de l'hôte.	
--	--	--	--	--	--

2.3.4 Entrée et réplication virale

L'entrée du VSRRP dans les cellules cibles se fait par endocytose via l'interaction du virus avec des récepteurs cellulaires. Les récepteurs cellulaires connus du VSRRP sont le sulfate d'héparane, la vimentine, le CD151, le CD163, la sialoadhésine aussi connue sous le nom de CD169 et la molécule DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) ou CD209 [318]. Les caractéristiques des récepteurs du VSRRP sont résumées dans le tableau suivante (Tableau 3).

Tableau 3. – Caractéristiques des récepteurs du VSRRP.

Récepteur	Taille	Implication dans l'infection par VSRRP	Références
Sulfate d'héparane	10–70 kDa	Interaction avec le complexe GP5-protéine M lors de l'attachement du virus à la cellule cible.	[318, 319]
Vimentine	54 kDa	Participe à la mobilisation du VSRRP à travers la membrane cellulaire pour favoriser sa pénétration dans le cytosol.	[318, 320]
CD151	28 kDa	Protéine de liaison à l'ARN qui se lie à la région 3' non traduite du génome du VSRRP.	[318, 321]
CD163	130 kDa	Participe probablement à la liaison et internalisation du virus. Nécessaire à la décapsidation du virus.	[318, 322, 323]
CD169 (sialoadhésine)	210-220 kDa	Liaison aux acides sialiques dans la protéine GP5 du virion. Implication dans l'endocytose du VSRRP dans la cellule.	[318, 324, 325]
CD209	46 kDa	Son interaction avec le VSRRP induit l'expression de gènes proinflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes.	[318, 326]

L'entrée du VSRRP montre des différences entre les cellules PAM et MARC-145, notamment au niveau des récepteurs cellulaires requis pour l'entrée du virus dans la cellule. Dans les PAM, le VSRRP interagit d'abord avec le sulfate d'héparane à la surface des macrophages. Ensuite, l'hétérodimère GP5 / M du virus interagit avec la sialoadhésine cellulaire de manière très stable, via le domaine de liaison à l'acide sialique présent dans la sialoadhésine du macrophage et les acides sialiques présents sur l'hétérodimère [324, 327]. Ceci est suivi par l'internalisation du complexe virus-récepteur via un processus d'endocytose médiée par la clathrine qui implique le cytosquelette d'actine de la cellule [328].

Dans les cellules MARC-145 le virus se lie d'abord à une molécule semblable à l'héparine [329], puis il est internalisé par endocytose médiée par la clathrine ou par une endocytose dépendante des lipides [330, 331]. Certaines études ont démontré que le cholestérol était impliqué dans l'entrée et la libération du virus [331, 332]. De plus, la protéine vimentine interagirait avec la protéine N du VSRRP pour assurer le transport du virus à l'intérieur des cellules infectées [333].

Le génome de l'ARN viral est ensuite libéré de l'endosome précoce vers le cytoplasme grâce à un processus dépendant du pH acide de l'endosome et de l'interaction avec le récepteur CD163 [322, 323]. Une fois que l'ARN génomique (ARNg) est libéré dans le cytoplasme, il agira comme ARN messager (ARNm). La machinerie translationnelle de l'hôte traduit les ORF1a et ORF1b pour obtenir les polyprotéines, qui seront ensuite clivées par les protéases pour obtenir les protéines non structurales (nsps) matures. Les nsps sont assemblées pour former un complexe de réplication et de transcription (RTC) qui est associé aux vésicules à double membrane (DMV) présentes dans le cytoplasme. Les DMVs sont vraisemblablement le site de réplication et de transcription du VSRRP [258, 334].

La réplication virale débute avec la transcription du génome viral ARN (+) en brin complémentaire génomique ARN (-) et des ARNm (-) sous-génomiques (ARNm sg). Les ARNm sg seraient synthétisés à partir de brins d'ARN (-) sous-génomiques, qui sont produits par un processus de synthèse discontinu de l'ARN [335] (Figure 7).

Les brins complémentaires génomiques ARN (-) vont servir de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes viraux infectieux ARN (+). Les ARNm sg (+) seront traduits pour former les

protéines structurales. Une fois que les nouveaux ARNg et les protéines structurales sont synthétisés, le virus est assemblé. L'assemblage du virion commence au site de réplication et se termine dans le réticulum endoplasmique (ER) ou le complexe de Golgi, où les protéines d'enveloppe sont retenues [334]. Les nouvelles particules virales formées sont accumulées dans des vésicules intracellulaires et la libération de nouveaux virions dans l'espace extracellulaire se fait par exocytose [336] (Figure 8).

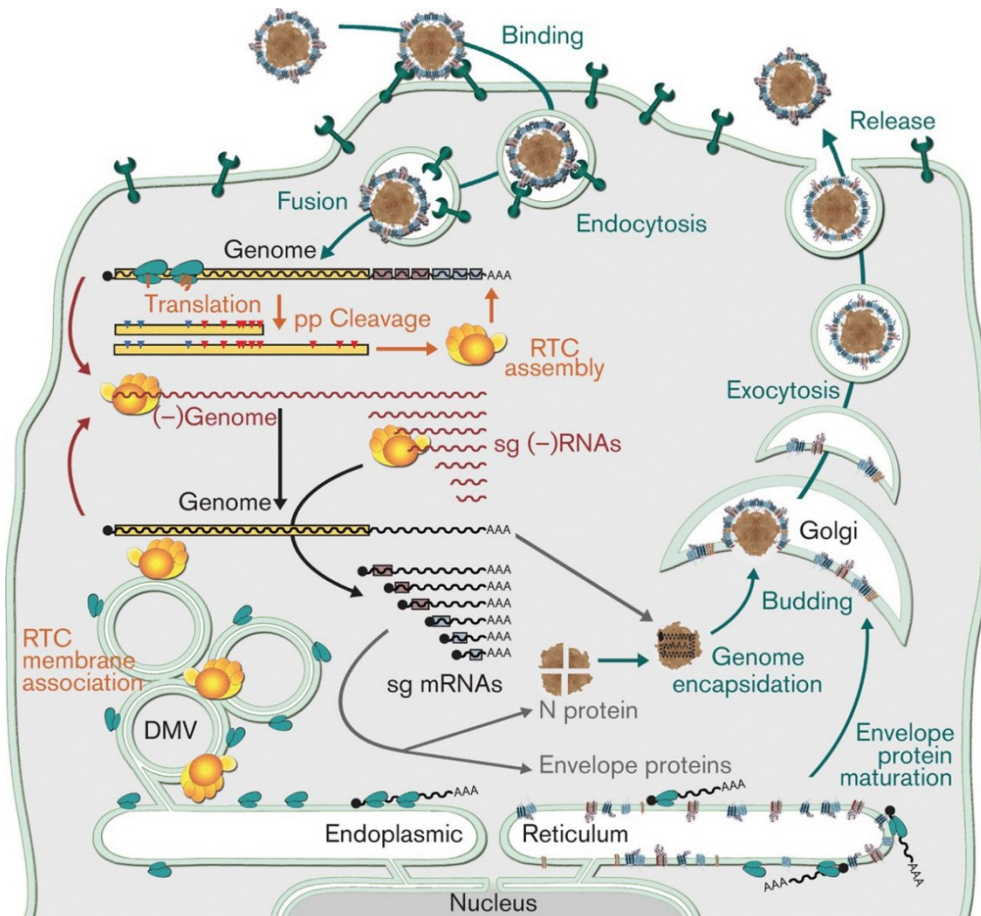


Figure 8. – Cycle de réplication du VSRRP. Tiré de [281].

2.3.5 Tropisme cellulaire

Le VSRRP infecte les cellules de la lignée monocyte/macrophage, en particulier les macrophages complètement différenciés des poumons, des organes lymphoïdes et du placenta [337, 338]. En fait, les macrophages alvéolaires porcins (PAM) sont reconnus comme les principales cellules cibles *in vivo* du VSRRP [337].

Chez les porcs infectés expérimentalement, en plus que dans les macrophages, l'ARN et la protéine de la nucléocapside (N) du VSRRP ont été détectés dans les cellules germinales testiculaires, les cellules endothéliales du cœur, les cellules interdigitées du thymus, les cellules dendritiques de la rate et les plaques de Peyer [339]. L'ARN et les antigènes du VSRRP ont été aussi retrouvés dans les cellules de l'épithélium des voies respiratoires du porc telles que les cellules épithéliales bronchiolaires ou les pneumocytes desquamés [340-342].

Les lignées cellulaires connu comme étant naturellement susceptibles à l'infection par le VSRRP *in vitro* sont les lignées cellulaires dérivés de rein de singe vert africain, MA-104, MARC-145, CL2621, VERO et Cos-7 [321, 343]. Les cellules SJPL (cellules épithéliales de singe) permettent aussi la réplication du VSRRP [344].

Le VSRRP possède un tropisme particulier pour les PAMs en culture primaire, mais la capacité de production du virus et l'étude de sa pathogénicité sont limitées, car ces cellules ne survivent pas à plusieurs passages [345]. En outre, l'utilisation de PAMs immortalisés pour la réplication de VSRRP est limitée puisque ces cellules ont perdu des protéines de surfaces essentielles à l'entrée du virus [346].

C'est pourquoi des lignées cellulaires ont été génétiquement modifiées pour qu'elles expriment les récepteurs viraux nécessaires à l'entrée du VSRRP [343, 347]. Des exemples de cellules qui supportent la réplication du VSRRP après modification génétique sont les iPAM 3D4/21 [347], les PK15 (lignée de cellules de rein de porc) [348], les CHO (lignée de cellules d'ovaires de hamster) [319], les NPT_r (ligne de cellules de la trachée de porcelets nouveau-nés) [349], les BHK-21 (cellules rénales de hamster nouveau-né) [333, 350, 351], les PK 032495 (cellules de rein de porc) [333], et les NLFK (cellules rénales félines) [350], entre autres [343].

2.3.6 Épidémiologie et pathogenèse virale

2.3.6.1 Épidémiologie

Le VSRRP est transmis principalement par contact direct mais aussi par contact indirect [352]. La transmission horizontale se fait via les sécrétions nasales, les aérosols ou la salive contaminée, ainsi que via l'urine, les matières fécales ou par la semence contaminée [353]. Le passage transplacentaire du virus de la truie vers le fœtus facilite la transmission verticale du virus, c'est-à-dire, de la mère vers sa progéniture au cours du stade prénatal [354, 355]. Les porcelets infectés par cette voie peuvent naître virémiques et le virus peut être isolé de leurs poumons ou tissus lymphoïdes [356, 357]. La transmission par contact indirect se fait à travers des fomites et des résidus contaminés [358, 359].

2.3.6.2 Maladie et signes cliniques

Une fois l'hôte exposé aux aérosols contaminés, le VSRRP passe par l'épithélium nasal, les macrophages des amygdales, les macrophages alvéolaires et le parenchyme pulmonaire pour rapidement s'étendre aux nœuds lymphatiques [342]. Par la suite, une virémie se développe, entre 3 et 7 jours post-infection et dure jusqu'à 14 à 21 jours post-infection [360]. Les souches virulentes du VSRRP peuvent induire une virémie dès les 12 premières heures après l'infection [361].

Le virus est retrouvé dans les poumons, les amygdales, les nœuds lymphatiques, le sérum, le thymus, la rate, le cœur, le cerveau, le plexus choroïde, la moelle osseuse, la muqueuse nasale, les glandes bulbo-urétrales, les ovaires, la semence et dans le muscle [233, 341, 362-366].

L'infection virale peut être asymptomatique et persistante mais peut aussi être sévère et fatale [367, 368]. Les signes cliniques usuellement décrits sont une anorexie, de la fièvre, de la dyspnée et de la léthargie [354, 369] chez les porcs jeunes ou en croissance et en finition. Une réduction de la prise de poids et une augmentation de la mortalité due aux infections secondaires sont également observées [370-372].

Chez les truies, le VSRRP peut provoquer de problèmes de la reproduction incluant des avortements au troisième tiers de gestation, des mort-nés, des fœtus momifiés, de la mortalité néonatale ainsi que des mises-bas prématurées [373].

Des problèmes respiratoires sont également présents, incluant des éternuements, de la toux et de la dyspnée [374]. Au niveau du poumon, les lésions macroscopiques sont bien démarquées et consolidées avec une décoloration diffuse [375]. Microscopiquement, une pneumonie interstitielle proliférative et nécrosante est souvent observée [233, 341], mais ces lésions ne sont pas pathognomoniques de l'infection au VSRRP.

2.3.7 Réponse du système immunitaire dirigée contre le VSRRP

2.3.7.1 L'immunité innée

Différentes études ont révélé que l'IL-8 est fortement exprimée [376] pendant l'infection par le VSRRP tandis que l'IL-6 peut être régulée à la hausse ou à la baisse lors de l'infection [377, 378]. De plus, le VSRRP induit la production d'IL-10, probablement à médiation de la protéine N du virus [379-381]. Cela stimule la production du récepteur CD163 à la surface des cellules de la lignée des monocytes/macrophages et atténue la réponse immunitaire à médiation cellulaire dès les premiers jours de l'infection [382].

Quelques études ont montré que le VSRRP peut diminuer la production de TNF- α tandis que d'autres études ont indiqué le contraire [383-385]. Des mutations ou délétions dans la protéine nsp2 pourrait être en cause dans ces résultats contradictoires [386].

Le VSRRP est capable de moduler de façon variée l'expression d'autres cytokines selon la souche virale. Renson *et al.* (2017) ont montré qu'une infection par la souche Lena induisait une quantité importante d'IFN- γ au niveau pulmonaire, comparativement à la souche Finistère, qui est moins virulente [387]. L'induction de TGF- β semble également être dépendent de la souche virale [377].

Le VSRRP est sensible aux IFNs de type I [388, 389]. Cependant, il a été rapporté que le virus est capable de réduire la production des IFNs dans les cellules infectées [382, 390, 391]. Les nsp1 et la protéine N du VSRRP seraient impliquées dans le blocage de la production des interférons de type I [392-394]. Le mécanisme le plus souvent signalé pour expliquer l'inhibition de la synthèse de l'IFN- β est l'inhibition de la phosphorylation d'IRF3, qui peut être médiée par nsp1, nsp2 et nsp11 [395, 396]. La phosphorylation d'IRF3 conduit à sa translocation vers le noyau cellulaire où il se lie au promoteur d'IFN- β . Une autre stratégie proposée est que nsp2 inhibe la polyubiquitination d'I κ B α , empêchant l'activation de NF- κ B, qui est un facteur de transcription

impliqué dans l'expression des IFNs de type I [397]. Finalement, Luo *et al.* (2008) ont montré que le VSRRP bloque les voies précoces d'activation des IFNs, soient les voies RIG et TLR3 [391].

2.3.7.2 L'immunité adaptative

Le VSRRP provoque l'apparition d'anticorps dits non neutralisants durant la phase précoce de l'infection. Ces anticorps peuvent être détectés après seulement 5 jours et sont composés d'IgM [398]. Les anticorps non neutralisants peuvent être des anticorps facilitants, c'est-à-dire, qu'ils facilitent la reconnaissance et l'internalisation des virions dans les macrophages [399], un mécanisme connu sous le nom de ADE (Antibody-dependant enhancement)[400]. Les protéines N, nsp1, nsp2 et nsp7 sont les cibles des anticorps non neutralisants [401, 402]. La protéine GP5 a été aussi signalé comme responsable de l'apparition d'anticorps facilitants dans les premiers jours de l'infection [399, 400]. La facilitation de l'infection par des anticorps (ADE) favorise les dommages cellulaires, la réplication, l'excrétion ainsi que la transmission virale [403].

Les anticorps neutralisants apparaissent tard dans l'infection virale, normalement à plus de 3-4 semaines après l'infection initiale et les titres sont généralement faibles [404, 405]. Les anticorps neutralisants sont généralement dirigés contre les protéines GP3, GP4, GP5 et M [399, 406-411]. Il est rapporté que ces anticorps induisent une protection efficace contre les souches homologues, mais sont de moindre efficacité contre des souches hétérologues [403].

La réponse à médiation cellulaire est tardive et implique majoritairement des lymphocytes T double positifs CD4+CD8+ qui seraient des lymphocytes T mémoires [412]. Cette réponse semble être dirigée principalement contre les protéines GP4, GP5, M et N [413-417].

2.3.8 Prévention et contrôle

La lutte contre le VSRRP repose sur son contrôle et son élimination au sein des troupeaux infectés [418-420]. La vaccination est l'une des stratégies couramment utilisées pour contrôler le VSRRP, parallèlement aux mesures de gestion et de biosécurité. Des vaccins vivants atténués, modifiés (MLV : Modified Live Virus Vaccines) ou inactivés (IV), basés sur les souches de VSRRP de génotype 1 et de génotype 2, sont disponibles.

Les vaccins vivants modifiés sont les principaux vaccins commerciaux utilisés actuellement [421]. Ils induisent une réponse immunitaire similaire à celle induite par les isolats de VSRRP légèrement virulents. Les vaccins homologues ou hétérologues MLV ont montré une certaine efficacité pour améliorer les performances de reproduction, réduire la mortalité, améliorer le taux de croissance et réduire l'excrétion des souches virales sauvages [422, 423].

L'un des risques de l'usage des vaccins MLV est la perte de leur atténuation en raison de l'instabilité génétique du virus et par conséquent, la réversion du vaccin à la virulence [424]. En fait, la recombinaison génétique de la souche vaccinale (MLV) avec des isolats de terrain a été rapporté [425-427].

Au Canada, les vaccins commerciaux vivants atténués disponibles sont Ingelvac[®] PRRS MLV, Reprocyc[®] PRRS-PLE et Ingelvac[®] PRRS ATP (Boehringer-Ingelheim Animal Health, Inc., Canada), ainsi que FOSTERA[®] PRRS (ZOETIS Canada Inc.)

Les vaccins inactivés (IV) ou « killed vaccine » (KV) ont été qualifiés de trop faible ou ayant une efficacité limitée [421, 428], mais contrairement aux MLV, les vaccins inactivés sont considérés comme sûrs [429].

La vaccination contre le VSRRP dans un contexte d'infections polymicrobiennes peut entraîner des résultats inattendus. Par exemple, il a été démontré que chez les porcs co-infectés par le VSRRP-2 et *M. hyopneumoniae*, l'infection bactérienne diminuerait le taux de cellules sécrétrices d'IFN- γ chez les porcs vaccinés avec le MLV, comparativement aux porcs vaccinés, uniquement infectés par le VSRRP-2 [430]. Une diminution de l'efficacité du vaccin de type MLV a été aussi rapporté chez des porcs co-infectés PCV2/VSRRP [431].

D'autres études ont montré que la vaccination avec un vaccin vivant modifié contre le VSRRP suivi d'une infection au VSRRP et au PCV2 protégeait contre le VSRRP, mais favorisait la réplication et la pathogenèse du PCV2, comparativement aux animaux non vaccinés [45]. Au moins trois mécanismes ont été suggérés comme étant impliqués dans l'induction de MACVP après la vaccination contre le VSRRP : 1) le vaccin MLV induirait la mitose des lymphocytes en réponse à la vaccination, augmentant ainsi la population de cellules permissives au PCV2, 2) le MLV peut supprimer l'immunité innée, bloquant ainsi les réponses anti-PCV2 et 3) le MLV peut fausser la réponse immunitaire vers la production d'anticorps non neutralisants spécifiques au PCV2 [45, 418, 419].

L'éradication du VSRRP au niveau local est possible grâce à la combinaison des mesures strictes de la biosécurité et la fermeture des troupeaux [432]. Cependant, l'adoption à grande échelle de cette procédure est limitée en raison des coûts, de la logistique et sa difficulté d'implantation et de mise en œuvre incluant la mise en place de bâtiments de ferme adaptés [418, 419].

D'autres mécanismes de contrôle du VSRRP, par le biais d'améliorations génétiques pour promouvoir la résilience de l'hôte, ont été explorés. Cette stratégie consiste à identifier des gènes liés à l'infection virale et à la persistance ou qui influencent la tolérance ou la résistance de l'hôte [433]. Différents groupes de recherche ont généré des porcs génétiquement modifiés ayant le récepteur CD163 muté ou éliminé. Les porcs génétiquement modifiés obtenus ont montré une résistance à l'infection par le VSRRP, tout en présentant une performance similaire à celle des porcs non-génétiquement modifiés [434-436].

De plus, des porcs génétiquement modifiés, ayant muté le récepteur CD163 ainsi que le récepteur du coronavirus de la gastro-entérite transmissible (TGEV), l'aminopeptidase N porcine (pAPN), ont été générés [437]. Les animaux obtenus étaient résistants au VSRRP ainsi qu'au TGEV tout en maintenant des performances de production normales.

Il est peu probable que l'édition de gènes remplace complètement les méthodes de contrôle existantes, telle que la vaccination. En revanche, la combinaison des stratégies génétiques avec la vaccination et la biosécurité a été suggérée pour lutter efficacement contre le VSRRP [438].

2.4 VIRUS DE L'INFLUENZA PORCINE (VIP)

2.4.1 Aspects historiques

En 1919, une maladie respiratoire grave a été constatée chez les porcs aux États-Unis [439]. Les signes cliniques chez les animaux ressemblaient aux ceux de la pandémie renommée « la grippe espagnole » A(H1N1) qui avait dévasté la population humaine en 1918 [439, 440]. Cette maladie aurait été introduite dans la population porcine à partir de l'homme durant la grippe espagnole [441].

Le premier virus grippal a été isolé chez les porcs par Richard Shope en 1930, confirmant la circulation du virus de sous-type H1N1 dite « porcine classique » (cH1N1) chez la population porcine aux États-Unis [441]. Le virus cH1N1 a été le sous-type viral prédominant dans la population porcine Nord-Américaine pendant près de 70 ans [442]. Selon une enquête sérologique menée à la fin des années 80, les virus grippaux classiques H1N1 circulaient très fréquemment chez les porcs aux États-Unis, contrairement au virus de l'influenza porcine (VIP) de sous-type H3N2 qui avait une très faible prévalence [443]. La première déclaration du virus H1N1 chez les porcs canadiens date des années 1980-1990 au Québec [444].

Le premier isolement d'un virus porcine H3N2 en Amérique du Nord a été signalé au Québec, Canada, en 1991. Cet isolat était antigéniquement similaire aux souches humaines de 1975 [445]. Cependant, le sous-type H3N2 ne s'est établi dans la population porcine nord-américaine qu'en 1998 [446]. À la même période, des virus H3N2 doubles (humain-porc) et triples (humain-porc-aviaire) réassortants ont circulé dans la population porcine, causant une maladie de modérée à sévère chez les porcs aux États-Unis [447]. Les virus trH3N2 se sont propagés rapidement à travers les États-Unis, établissant une lignée virale stable au sein de la population porcine [446]. Au Canada, ce n'est qu'en 2005 que le trH3N2 s'est établi, infectant les porcs et les dindons [448].

Actuellement, on distingue des souches de VIPs qui se sont adaptés aux porcs et qui se sont propagées et qui circulent dans la population porcine, dites « enzootiques » et des VIPs qui sont détectés ponctuellement dites « sporadiques ». Tous les virus influenza porcins, enzootiques ou sporadiques, sont à potentiel zoonotique [449-451].

Un souche de VIP de sous-type H1N1 non décrit auparavant a été détecté chez des humains en mars et avril 2009 au Mexique et aux États-Unis [452, 453]. Cette nouvelle souche a été responsable de la pandémie humaine de grippe A H1N1 qui a causé entre 151 700 et 575 400 décès [454]. Le génome de ce virus pandémique (A(H1N1)pdm09) contient des gènes des virus de la grippe A humaine, aviaire et porcine [455, 456]. L'infection respiratoire chez les humains causée par le virus A(H1N1)pdm09 était communément appelée grippe porcine parce que la souche virale était dérivée de plusieurs virus circulant chez les porcs où la transmission initiale à l'homme s'est produite plusieurs mois avant l'éclosion chez l'homme [456]. Il faut souligner que le porc n'aurait pas impliqué dans la propagation mondiale du virus durant la pandémie humaine. En fait, le virus s'est propagé d'humain à humain par des gouttelettes en suspension dans l'air, et potentiellement, par contact humain avec des objets inanimés contaminés par le virus et transférés aux yeux ou au nez [457].

Le premier cas positif au virus A(H1N1)pdm09 a été rapporté dans la population porcine canadienne en avril 2009 en Alberta [458]. Ce serait le premier cas confirmé de A(H1N1)pdm09 chez des animaux signalé par l'Organisation mondiale de la santé animale (WOAH) en mai 2009 [458]. La transmission de l'humain aux porcs était la source probable de l'infection [459, 460]. Après le premier rapport, d'autres troupeaux porcins canadiens au Manitoba, en Saskatchewan et au Québec ont été signalés positifs au virus A(H1N1)pdm09 en 2009 [458, 461, 462]. L'infection par le virus A(H1N1)pdm09 chez les porcs a été rapporté la même année dans d'autres pays comme l'Argentine, l'Australie et l'Irlande [458].

2.4.2 Taxonomie

Les virus influenza appartiennent à la famille virale *Orthomyxoviridae* qui comprend neuf genres de virus : *Alpha-* ; *Bêta-*; *Delta-* et *Gamma-influenzavirus* ; *Isavirus* ; *Mykissvirus*; *Quaranjavirus* ; *Sardinovirus* et *Thogotovirus* [236].

Les virus responsables de la grippe porcine appartiennent au genre *Alphainfluenzavirus*, l'espèce Influenza A virus (Renommé en 2021 *Alphainfluenzavirus influenzae*) [236]. Les porcs peuvent être infectés naturellement et expérimentalement par le virus de l'influenza de type C (*Gammainfluenzavirus*) et D (*Deltainfluenzavirus*), mais la maladie clinique survient rarement [463-467].

Au sein du type A, les virus de l'influenza sont divisés en sous-types, basée sur des propriétés antigéniques des glycoprotéines de surface du virion : l'hémagglutinine (HA ou H) et la neuraminidase (NA ou N). Actuellement, 18 HA (H1-18) et 11 NA (NA1-11) ont été identifiées [468].

Selon une recherche réalisé par Chauhan et Gordon en 2020 [469], concernant la circulation des génotypes de virus grippaux dans les populations porcines, les virus H1N1, H1N2, H3N2 et A(H1N1)pdm09 sont les sous-types de VIP les plus souvent identifiés chez les porcs dans la plupart des pays du monde.

2.4.3 Caractéristiques du virion, génome et protéines

Les virus Influenza A sont de virus enveloppés, pléomorphes, d'un diamètre de 80 à 120 nm, avec une nucléocapside a symétrie hélicoïdale d'environ 6-9 nm de diamètre et d'environ 60 nm de longueur [470].

Le virus contient un génome d'ARN a polarité négative, segmenté, de 14 kb. Les huit segments d'ARN qui composent le génome viral sont encapsidés individuellement par des oligomères de la nucléoprotéine NP et codent pour au moins 10 protéines [471] (Figure 9).

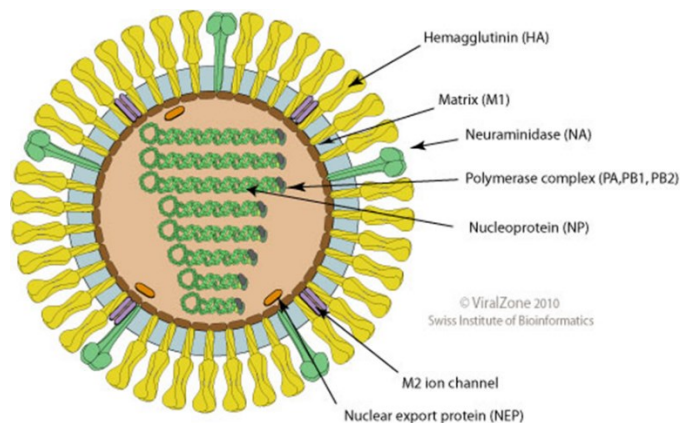


Figure 9. – Représentation schématique d'un virion Influenza A montrant les protéines et ribonucléoprotéines virales. Tiré de (<http://viralzone.expasy.org>). © ViralZone 2010, Swiss Institute of Bioinformatics. Permission accordée.

Les segments 1, 3, 4, 5 et 6 codent pour une seule protéine par segment : les protéines PB2, PA, H/HA, NP et N/NA, respectivement. Le segment 2 code pour la sous-unité PB1 de la polymérase virale et aussi pour la protéine accessoire PB1-F2 dans un cadre de lecture alternatif +1. Le segment 7 code pour la protéine de la matrice M1 et le canal ionique M2, la dernière est obtenu par épissage de l'ARNm. Le segment 8 code pour la protéine NS1 et, par épissage de l'ARNm, il code également pour la protéine NEP/NS2 [470].

Les glycoprotéines de surface transmembranaires HA et NA sont associées en trimère et en tétramère, respectivement, formant les spicules qui recouvrent le virion. La protéine basique 1 de la polymérase du virus (PB1), la protéine basique 2 de la polymérase virale (PB2) et la protéine acide de la polymérase du virus (PA) forment le complexe ARN polymérase ARN-dépendante [470, 472].

Le tableau suivant résume les principales caractéristiques et fonctions des protéines du virus de l'influenza type A (Tableau 4).

Tableau 4. – Caractéristiques et fonctions des protéines du virus de l'influenza type A

Segment d'ARN	Protéine(s) codée(s)	Taille (kDa)	Caractéristiques et fonction des protéines	Références
1	PB2	≈ 85,7	Participe à la reconnaissance de la coiffe de l'ARNm. Implication dans la transcription et la réplication virale.	[470, 473]
2	PB1	≈ 86,5	Possède une activité d'endonucléase pour le clivage des coiffes situées en 5' des ARNm. Implication dans la transcription et la réplication virale.	[470, 473, 474]
	PB1-F2	≈ 10,5	Activité pro-apoptotique. Implication dans diverses fonctions : blocage de la voie de signalisation RIG-I, modulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3, favorise l'activité de la polymérase et la pathogénicité virale.	[470, 475]

3	PA	≈ 84,2	<p>Activité protéase.</p> <p>Implication dans la transcription et la réplication virale.</p>	[470, 476]
4	HA	≈ 61,5	<p>Glycoprotéine de surface homotrimérique.</p> <p>La protéine la plus abondante dans l'enveloppe virale (occupe approximativement 80% de la surface des virions).</p> <p>Fonctions d'attachement au récepteur cellulaire et de fusion.</p> <p>Cible principale des anticorps neutralisants.</p>	[470, 477, 478]
5	NP	56	<p>Unité structurale de ribonucléoprotéines (RNP).</p> <p>Implication dans le transport, la transcription et la réplication du génome viral.</p>	[470, 479]
6	NA	55	<p>Glycoprotéine de surface, homotétramère en forme de champignon.</p> <p>La deuxième protéine la plus abondante dans l'enveloppe virale (occupe approximativement 17 % de la surface des virions).</p> <p>Contient l'activité sialidase.</p> <p>Participe à l'étape de bourgeonnement viral.</p> <p>Clive les liaisons formées entre l'HA et les résidus d'acide sialique permettant la libération des virions nouvellement formés.</p>	[470, 480]
7	M1	28	<p>Protéine matricielle.</p> <p>Forme la couche matrice localisée entre la membrane lipidique et les ribonucléoprotéines virales (RNPvs).</p> <p>Régulation de l'exportation nucléaire d'ARNm.</p> <p>Implication dans le bourgeonnement viral.</p>	[470, 481]
	M2	11	Homotétramère.	[470, 482]

			Canal ionique qui permet l'acidification de la partie interne du virion causant une dissociation de la couche matrice M1 et la libération du génome virale dans le cytoplasme.	
8	NS1	≈ 27	Protéine non structurale. Implication dans l'inhibition de la production d'IFNs de type I (α/β). Induction de l'apoptose. Contrôle l'épissage et la traduction des ARNm viraux. Régulation de l'expression génique de l'hôte.	[470, 483]
	NEP/NS2	≈ 11	Implication dans l'export nucléaire de l'ARN viral.	[470, 484]

2.4.4 Entrée et réplication virale

Le cycle de réplication viral débute par la liaison du virus à des récepteurs d'acide sialique situés à la surface des cellules cibles (Figure 10). Les récepteurs sont différents chez les diverses espèces animales. Les virus de l'influenza humain se lient à l'acide sialique lié en α -2.6 au galactose des glycoprotéines des cellules épithéliales du tractus respiratoire, ayant alors, un tropisme respiratoire [485]. Cependant, les virus de l'influenza aviaire, ayant un tropisme digestif, se lient à l'acide sialique lié en α -2.3 au galactose des glycoprotéines des cellules épithéliales du tractus digestif [486]. Chez le porc, les deux types de récepteurs d'acide sialique sont présents, ce qui permet la recombinaison entre les virus de l'influenza d'origine aviaire et humaine dans cet animal [487]. Ce phénomène a été à l'origine des pandémies mortelles [488].

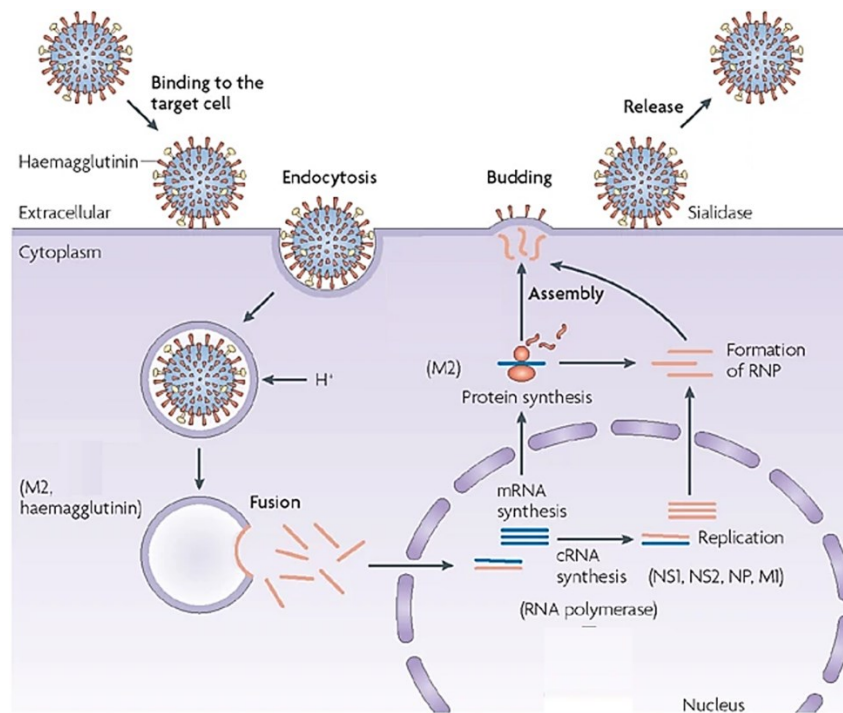


Figure 10. – Cycle de réplication du virus de l’influenza A. Tiré de [489] avec modification.
 © 1969, Nature Publishing Group. Permission accordée.

La liaison du virus aux résidus d’acides sialiques se fait via la protéine virale HA située sur l’enveloppe virale. L’HA est d’abord synthétisée sous la forme d’un précurseur HA0 non fonctionnel. Lors de l’infection virale, la HA0 est clivé par des protéases extracellulaires et transmembranaires en deux sous-unités HA1 et HA2, rendant le virus infectieux. La HA1 intervient dans la fixation du virus au récepteur cellulaire, tandis que la sous-unité HA2 catalyse la fusion membranaire [490]. Une fois le virus fixé à la cellule, l’entrée se fait par endocytose via des vésicules à clathrine [491]. Grâce aux canaux à protons formé par la protéine virale M2 et grâce à des ATPases cellulaires, l’intérieur de l’endosome devient acide, ce qui provoque la fusion de la membrane virale à celle de l’endosome. Ensuite, l’intérieur du virion s’acidifie causant une dissociation de la ribonucléoprotéine virale (vRNP) de la couche de protéines M1 qui tapissent l’intérieur de la particule virale. Cela va permettre la libération des complexes vRNP dans le cytoplasme de la cellule [492]. Les 8 complexes de vRNP vont ensuite migrer vers le noyau cellulaire grâce à des signaux de localisation nucléaire (NLS) qui se trouvent au niveau de la protéine NP [493].

A l'intérieur du noyau, le complexe trimérique ARN-polymérase ARN-dépendant réalise la transcription et la réplication des ARNs viraux (ARNv). Le complexe de l'ARN polymérase initie la transcription de l'ARN viral par le biais d'un mécanisme dénommé « vol de coiffe » (cap-snatching en anglais) [494]. La coiffe des ARN messagers (ARNm) à l'extrémité 5', est un l'élément nécessaire aux ARNm pour être reconnus et traduits par les ribosomes. L'ARN polymérase du virus de l'influenza ne peut pas synthétiser et méthyler les structures de la coiffe. Ainsi, l'ARN polymérase virale associée aux vRNP se lie à l'ARN polymérase II de l'hôte (Pol II) pour amener les vRNP à proximité des ARN de l'hôte, qui sont coiffés à l'extrémité 5' [495]. Le domaine de liaison à la coiffe PB2 lie ensuite la coiffe 5' de l'ARN hôte naissant et le domaine endonucléase PA clive l'ARNm 10–14 bases en aval de la coiffe. Ce morceau d'ARN ainsi généré est utilisé en tant qu'amorce par la sous-unité PB1 pour initier la transcription de l'ARNm viral. L'ARNv (-) sert de matrice pour la fabrication d'ARNm, qui sera par la suite exporté dans le cytoplasme pour la synthèse des protéines virales [470].

La réplication du génome viral est un processus en deux étapes. Contrairement à la transcription, l'initiation de la réplication se produit d'une manière dite *de novo* (indépendante de l'amorce) [496]. La première étape est la formation d'un ARN complémentaire positif ARNc (+) à partir de l'ARN viral négatif ARNv (-), qui est assemblé en une ribonucléoprotéine complémentaire (cRNP), une structure similaire à vRNP [497]. L'obtention de cRNP implique la complémentarité correcte des triphosphates de nucléotides libres (généralement GTP et ATP) avec l'extrémité 3' de la matrice d'ARNv. La complémentation nucléotidique entraîne la formation d'un dinucléotide A-G à partir duquel l'ARNc est allongé. L'ARNc s'associe alors à des molécules NP nouvellement synthétisées et à une seule copie de la polymérase virale pour s'assembler en une cRNP [492]. L'expression de l'ARN polymérase et du NP est en effet essentielle pour l'accumulation de l'ARNc lors de l'infection.

Dans la deuxième étape de la réplication, l'ARNc agit comme un modèle pour la synthèse de l'ARNv. Contrairement à l'initiation lors de la première étape, l'initiation de cette étape se produit à l'intérieur de la matrice de l'ARNc aux positions 4 et 5 pour produire un dinucléotide pppApG, qui se dissocie et se replace ensuite sur les bases aux positions 1 et 2, afin de commencer la réplication [498]. La transcription de l'ARNv se déroule de la même manière que la synthèse de

l'ARNc et, de même, plusieurs NP et une polymérase virale se lient à l'ARNv nouvellement transcrit pour produire une nouvelle ribonucléoprotéine virale (vRNP).

Les protéines de l'enveloppe HA, NA et M2 sont synthétisées, et après une modification post- traductionnelle au niveau du réticulum endoplasmique, elles vont 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 et NP sont importées dans le noyau cellulaire pour former de nouveaux cRNP ou vRNP afin de permettre la transcription d'ARNm viraux, la réplication du génome viral ainsi que la formation de nouveaux complexes vRNP qui seront encapsidés dans les nouvelles particules virales produites [470, 492] . L'exportation nucléaire de segments d'ARNv est médiée par les protéines virales M1 et NEP/NS2, grâce à la liaison de ces protéines aux complexes vRNP néo-synthétisés et à la présence des motifs d'exportation nucléaire sur les protéines NS2 [484, 499]. Après l'exportation nucléaire, les vRNP sont recrutés et accumulés au site d'assemblage dans la face interne de la membrane plasmique où sont déjà insérées les protéines de surface de l'enveloppe virale HA, NA et M2 [492].

Les huit segments des vRNP de sens négatif sont nécessaires pour produire une particule virale infectieuse. La protéine M1 joue un rôle critique dans le processus d'assemblage et de bourgeonnement. Elle va faire une asymétrie dans la bicouche lipidique pour ainsi créer un bourgeonnement [499]. Les nouveaux virions restent retenus par liaison aux récepteurs à l'acide sialique. La NA va alors cliver l'acide sialique des récepteurs membranaires pour éviter l'agrégation des particules virales à la surface des cellules hôtes infectées et favoriser ainsi la libération des nouveaux virions dans l'espace extracellulaire et subséquent dans les voies respiratoires d'un hôte infecté [500].

2.4.5 Émergence de nouveaux virus de l'influenza porcin

On définit par virus influenza porcin (VIP) un isolat de virus influenza obtenue à partir d'un prélèvement biologique de porc. L'apparition d'un nouveau variant du VIP, différent de ceux déjà identifiés chez le porc, s'explique par les mêmes mécanismes déjà décrits pour l'apparition de nouveaux variants du virus de l'influenza de type A : 1) la dérive génétique ou glissement antigénique et 2) le réassortiment génétique ou cassure antigénique.

2.4.5.1 La dérive génétique ou glissement antigénique

La « dérive génétique » ou « glissement antigénique » est le processus par lequel des modifications génétiques (mutation, délétion, insertion) conduisent à des modifications au niveau des épitopes antigéniques viraux clés lors du cycle de réplication virale [501]. Ce phénomène s'explique par le fait que l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus est dépourvue de mécanisme de relecture et d'activité correctrice [502]. Le virus de l'influenza avec un taux de substitutions de 10^{-5} à 10^{-6} substitutions/site/cycle de réplication [503, 504] peut se retrouver chez un même hôte au sein d'une population virale hétérogène que l'on appelle « quasi espèce » [505, 506]. L'accumulation de ces mutations au niveau des sites fonctionnels ou structuraux peut être létale pour le virus. En revanche, lorsque les mutations concernent les gènes codant l'hémagglutinine (HA) ou la neuraminidase (NA), elles peuvent conduire à un « glissement antigénique » (drift) et à l'émergence d'un nouveau « variant » antigénique. Cela peut provoquer, à son tour, l'échappement du virus vis-à-vis de la réponse immunitaire acquise, ainsi que l'apparition de modifications au niveau de la pathogénicité virale et de sa résistance aux drogues antivirales [501, 507, 508], (Figure 11).

2.4.5.2 Le réassortiment génétique ou cassure antigénique

La cassure antigénique résulte des modifications génomiques importantes en raison de la nature segmentée du génome du virus de l'influenza. Lors de l'infection d'un hôte par deux sous-types viraux simultanément, les segments d'ARN des deux virus peuvent être répliqués et interchangés (réassortiment génétique) lors de l'assemblage des nouveaux virions dans la même cellule hôte [509, 510]. Quand le réassortiment implique les gènes HA ou NA, cela entraîne le remplacement d'un antigène majeur ou « cassure antigénique » (shift). L'apparition de ces nouvelles souches virales (virus ressortant) ont été à l'origine de grandes pandémies du virus influenza [511-514].

Les porcs peuvent être infectés naturellement par des virus influenza d'origine humaine et aviaire. Ce phénomène est causé par le fait que chez le porc, on retrouve tout le long du tractus respiratoire des récepteurs de type AS- α 2,6-Gal (récepteurs des virus de l'influenza humaine) mais également de récepteurs de type AS- α 2,3-Gal (récepteurs des virus de l'influenza aviaire) [487]. C'est ainsi que le porc, en tant qu'hôte intermédiaire, peut jouer un rôle important dans la génération de virus réassortants à potentiel zoonotique [514, 515] (Figure 11).

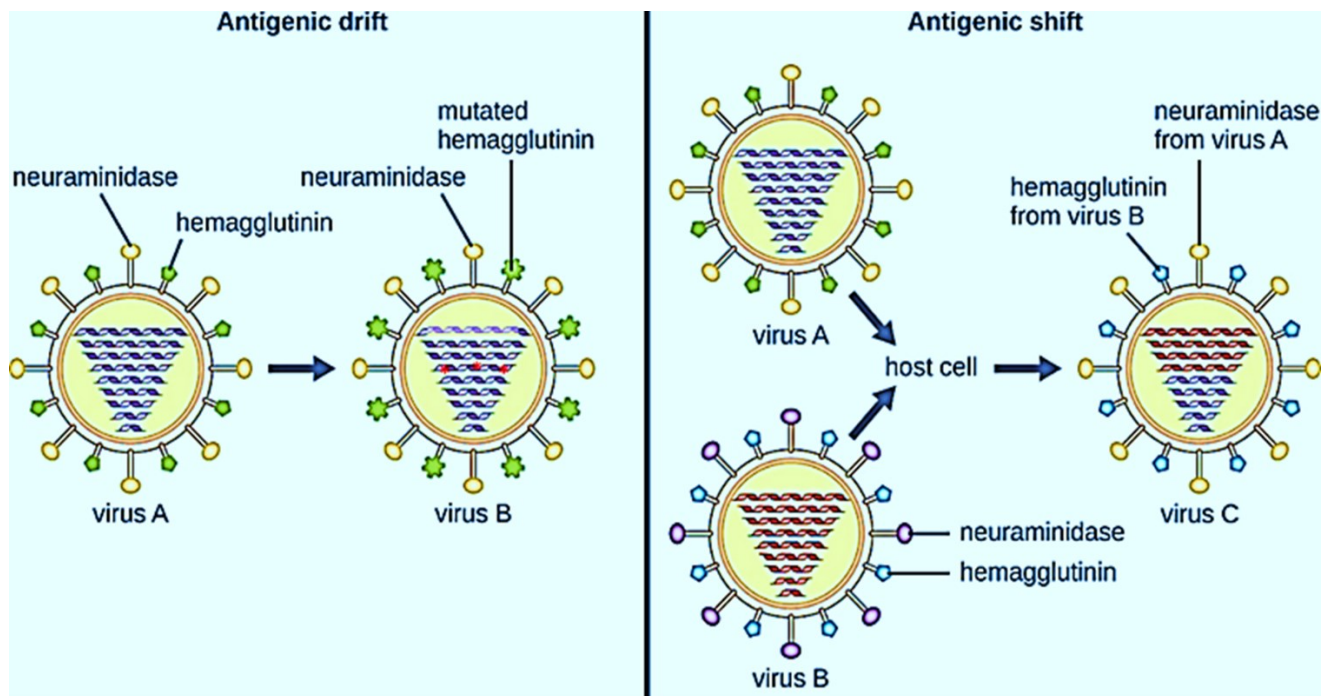


Figure 11. – Dérive génétique et réassortiment génétique du virus influenza A. Tiré de (<https://open.oregonstate.education/microbiology/chapter/15-3virulence-factors-of-bacterial-and-viral-pathogens/>). ©Creative Commons.

2.4.6 Tropisme cellulaire

Les VIPs ciblent principalement les cellules épithéliales du tractus respiratoire porcin, le poumon étant le principal site de réplication viral [516, 517]. La distribution cellulaire du virus varie avec le temps lors de l'infection. Il a été rapporté que le VIP de sous-type H1N2 se retrouve principalement dans les cellules épithéliales bronchiques et bronchiolaires au début de l'infection, alors qu'il est détecté principalement dans les pneumocytes et les macrophages plus tard dans l'infection [516]. Outre les macrophages (alvéolaires et interstitiels), d'autres cellules immunitaires comme les cellules dendritiques peuvent être infectées par les VIPs [518].

Les méthodes d'isolement et de propagation du VIP incluent l'inoculation d'œufs de poule embryonnés âgés de 10 à 11 jours et l'inoculation virale des cellules MDCK, utilisant la trypsine comme additif [519]. D'autres lignées cellulaires comme les MRC-5, Vero, ST, SJPL, PK, BHK 21 et NPTr ont été utilisés pour multiplier différentes souches de virus influenza type A avec des succès variables [349, 520-522]. La réplication *in vitro* du virus influenza dans les cellules cause généralement des effets cytopathiques (CPE) [523].

2.4.7 Épidémiologie et pathogenèse virale

2.4.7.1 Épidémiologie

Les VIP se transmettent à travers des sécrétions des animaux infectés ou via des objets contaminés. Les aérosols et les gouttelettes contaminés produits lors d'épisodes de toux et d'éternuements constituent une voie de transmission importante [524]. L'excrétion du virus par les porcs infectés se fait dès 24 hpi et les animaux restent contagieux pendant environ 7 jours [525]. Les signes cliniques de la grippe porcine coïncident généralement avec la présence du virus dans les sécrétions nasales, la salive et les poumons [524, 526].

2.4.7.2 Maladie et signes cliniques

Le VIP est le responsable de la grippe porcine, une maladie aiguë et hautement contagieuse dont le taux de morbidité est élevé ($\approx 100\%$) mais la mortalité demeure faible ≈ 1 à 4% chez les porcs malades [527, 528].

Lors de l'infection, le virus de la grippe se réplique d'abord dans les cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures et s'étend aux voies respiratoires inférieures à mesure que la maladie

progressive. Il y a une réplique étendue au niveau des bronches et des alvéoles pendant 5 à 6 jours, suivi d'une élimination de l'infection 1 semaine après l'infection [517, 529].

Au niveau du poumon, l'infection virale provoque chez le porc infecté des lésions typiques de pneumonie [516]. Les zones affectées du poumon sont clairement délimitées, effondrées et rouge violacées. Les lésions pulmonaires microscopiques incluent une bronchiolite et une pneumonie interstitielle caractérisés par la nécrose de l'épithélium pulmonaire et la desquamation de la couche de cellules épithéliales bronchiques et/ou bronchiolaires [530]. Il y a aussi une obstruction des voies respiratoires par des cellules nécrosées et des cellules du système immunitaire/inflammatoire provoquant une hépatisation pulmonaire [531].

La plupart des dommages causés aux voies respiratoires par le virus de l'influenza sont dus à la destruction virale directe par nécrose des cellules infectées [525]. Le contrôle insuffisant de la réponse inflammatoire induite par le virus, a également été associé à l'immunopathologie et à des lésions pulmonaires étendues [517, 532].

Les porcs peuvent être infectés avec le VIP sans montrer de signes cliniques, mais l'infection virale peut également causer une grippe d'intensité modérée à élevée [533]. La sévérité de la maladie dépend de la virulence de la souche virale impliquée, du statut immunitaire des animaux ainsi que de la présence des infections virales ou bactériennes concomitantes [528, 530]. La forme plus sévère de la grippe se caractérise par des manifestations cliniques marquées, de l'hyperthermie et des signes respiratoires sévères, incluant la toux quinteuse et dyspnée qui peuvent persister plusieurs jours et éventuellement induire la mort dans les cas compliqués par l'infection avec d'autres pathogènes [534, 535]. Chez les truies gestantes, l'infection par le VIP peut également provoquer des avortements [536, 537].

2.4.8 Réponse du système immunitaire dirigée contre le VIP

2.4.8.1 L'immunité innée

Les différents composants du système immunitaire inné constituent la première ligne de défense contre l'infection causée par le VIP. Leur but est de prévenir l'infection des cellules épithéliales respiratoires (le mucus, les collectines et les protéines de la phase aiguë) ou de contrôler la dissémination du virus et de déclencher la réponse antivirale (les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules NK) [538].

Les études réalisées par Van Reeth *et al.* (2002), ont démontré que l'augmentation des concentrations d'IFN- α , de TNF- α et d'IL-6 après une infection par le VIP était liée à une augmentation de la réplication du virus et au développement de la maladie [529]. Également, Pomorska-Mól *et al.*, (2014), ont étudié les réponses inflammatoires et immunitaires porcines au cours de la grippe aiguë causée par le VIP de sous-type H1N1 (VIP H1N1) chez des porcs infectés expérimentalement [539]. Les auteurs ont constaté que les concentrations locales d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10 et d'IFN- γ étaient élevées chez les porcs inoculés avec le VIP H1N1. En accord avec ces résultats, une augmentation de la concentration pulmonaire d'IFN- α , d'IFN- γ , d'IL-6 et d'IL-10 après une infection expérimentale de porcs avec le VIP H1N1 a également été rapportée par Turlewicz-Podbielska *et al.* (2021) [540].

Il est connu que les IFNs de type I et III sont rapidement induits après une infection par le VIP grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs : Pattern recognition receptors) comme les récepteurs de type Toll, les récepteurs de type RIG-I et les récepteurs de type NOD, trouvés dans les cellules épithéliales respiratoires. Les IFNs libérés se lient à leurs récepteurs et activent la voie de signalisation JAK-STAT. Cela déclenche la transcription de centaines de gènes stimulés par l'interféron (ISG) qui induisent un « état antiviral » dans les cellules infectées et avoisinantes pour finalement restreindre la réplication et la propagation virales [37, 349, 541, 542].

Le virus de l'influenza, en revanche, utilise différentes stratégies pour contrer la réponse antivirale de l'IFN [543-547]. La protéine non structurale NS1 semble être la protéine antagoniste de l'IFN la plus importante du virus. NS1 atténue la réponse de l'IFN en réduisant l'activation de voies de signalisation RIG-I, PKR et OAS. En outre, NS1 inhibe le traitement des ARNm cellulaires et son

exportation vers le cytoplasme pour empêcher l'expression de l'IFN et des ISG [544, 545, 547]. D'autres protéines virales ont également été impliquées dans la suppression de l'expression des IFNs, comme NP qui semble inhiber l'activation de la voie PKR [548] ou PB1-F2 et PB2, qui inhibent la fonction de MAVS, un adaptateur mitochondrial essentiel pour l'induction de l'IFN par la voie RLR [549, 550]. En outre, le virus de l'influenza peut induire les régulateurs cellulaires négatifs de la signalisation IFN, comme SOCS [551].

2.4.8.2 L'immunité adaptative

Après une première infection par le VIP, il y a une induction des anticorps sériques d'isotypes IgM, IgG et IgA [552]. Les anticorps IgM sont des anticorps neutralisants et peuvent également activer la voie du complément [553], mais ils ne sont pas présents lors d'une deuxième infection [552]. La réponse humorale est dirigée principalement contre les protéines HA, NA, M et NP [552]. Mary E. Larson *et al.* (1995), ont détecté des IgM et des IgG HA spécifiques dès 3 jours après l'infection expérimentale avec une souche de terrain de VIP (H1N1). Des IgA spécifiques ont été détectées le quatrième jour suivant l'infection dans des échantillons de la muqueuse nasale [554].

Les anticorps maternels sont importants dans la protection des porcelets contre l'infection par le VIP et peuvent être détectés entre 4 et 14 semaines d'âge [555]. Cependant, il a été observé que des niveaux élevés d'anticorps maternels ne correspondaient pas nécessairement à une protection adéquate et, par conséquent, les porcelets peuvent être sensibles à la réinfection [556]. En ce qui concerne l'immunité croisée ou hétérologue, il a été montré que l'infection par un VIP H1N1 protégeait partiellement les porcs contre une infection ultérieure par un virus du sous-type H3N2 [557].

Différentes études ont montré l'importance de l'immunité préexistante des lymphocytes T dans la protection contre la grippe porcine. Hiremath, J., *et al.* (2016) ont induit la production des lymphocytes T CD8+ ou CD4+ spécifiques au VIP dans les poumons de porcs sans générer d'anticorps spécifiques, à l'aide d'un cocktail des peptides administrés par voie intranasale dans des nanoparticules dégradables. Comme résultat, les auteurs ont observé une réduction de la charge virale dans le poumon porcin et une réduction des symptômes cliniques de la grippe à la suite d'une infection avec un virus H1N1 hétérologue [583].

Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ ont un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire et la clairance virale, respectivement [552]. Une étude comparative sur les sous-groupes de lymphocytes isolés chez des porcelets exempts de pathogènes (SPF) et infectés expérimentalement avec le VIP, le VSRRP ou le PCV2 a montré que uniquement le VIP avait généré une augmentation significative des cellules CD4+ et CD4CD8+ dans le lavage broncho-alvéolaire (BAL) des animaux infectés [558]. Il a été mis en évidence que les cellules CD8+ migrent vers les poumons et le BAL dès 6 jours post-infection avec le VIP H1N1 [517, 559].

En conclusion, selon divers rapports, la protection contre l'infection par le VIP dépend principalement des IgA sécrétoires à la surface des muqueuses, contribuant à l'immunité nasale et des anticorps IgG, contribuant à l'immunité pulmonaire. De plus, les IgG et les lymphocytes T CD8+ empêchent la progression de l'infection et éliminent le virus pendant la phase de récupération [560].

2.4.9 Prévention et contrôle

Une fois que la grippe porcine est établie dans une ferme, il est difficile à l'éliminer complètement et le dépeuplement des troupeaux peut être nécessaire [561]. Les mesures de contrôle sont plus efficaces lorsqu'elles sont appliquées de manière préventive afin d'empêcher la grippe porcine, plutôt que de manière rétrospective pour éliminer un foyer d'infection [562, 563].

Les différentes mesures de contrôle comprennent des stratégies de biosécurité et de gestion des élevages, la surveillance, et la vaccination des animaux, cette dernière constitue la principale stratégie prophylactique de lutte contre le VIP. Les programmes de vaccination des porcs sont dirigés contre les souches porcines enzootiques et ne préviennent pas les infections des porcs par des souches d'origine aviaire ou humaine [30].

Les deux types de vaccins approuvés et testés pour les porcs sont: les vaccins inactivés et les vaccins vivants - atténués [564]. Les vaccins inactivés constituent la méthode traditionnelle et la plus sûre de lutte contre le VIP. L'absence de réplication élimine le risque de réassortiment avec les souches circulantes sur le terrain. Ces vaccins sont utilisés soit chez les truies pour les protéger pendant la gestation et leurs porcelets pendant la période d'allaitement, soit chez les porcs en croissance pour réduire les signes cliniques [565], via l'induction des anticorps sériques neutralisants qui ciblent la protéine HA virale [566]. Tous les vaccins homologués actuellement

disponibles sur le marché ciblent les principales souches endémiques porcines H1N1, H1N2 et H3N2 [567].

Le premier vaccin inactivé recombinant approuvé contre le VIP aux États-Unis était un vaccin produit en utilisant la plateforme de particules de réplicon à ARN de type alphavirus de Harrisvaccines, Inc., actuellement Merck Animal Health, au début des années 2010 [568]. Ce vaccin consistait en un virus atténué de l'encéphalite équine vénézuélienne, dont la réplication était défectueuse, en raison de la substitution de gènes structurels de ce virus par le gène HA d'un isolat clinique du Midwest américain du VIP appartenant au clade IV H3N2. Ce vaccin a été approuvé et commercialisé également au Canada [569].

En plus des vaccins commerciaux, des vaccins autogènes inactivés, contenant des souches spécifiques aux troupeaux affectés, sont également utilisés. Aux États-Unis, environ 50 % des vaccins inactivés utilisés sont des vaccins autogènes [564].

Les vaccins inactivés ont certains désavantages, par exemple, ils sont moins efficaces contre les souches antigéniquement divergentes de la souche vaccinale [570]. Leur efficacité chez les jeunes porcelets est souvent limitée par la présence d'anticorps d'origine maternelle [570, 571]. De plus, une maladie aggravée associée aux vaccins a été observée expérimentalement chez des porcs vaccinés avec des vaccins à virus inactivé entier avec adjuvant et puis confrontés à des souches hétérologues [572, 573]. L'induction d'anticorps non neutralisants par des vaccins qui ne neutralisent pas le virus mais que exacerbent plutôt la réplication virale et l'aggravation de la maladie expliquerait ce phénomène [573].

Les vaccins réplicatifs ou les vaccins vivants atténués sont constitués de virus génétiquement modifiés pour réduire la réplication virale. L'atténuation du virus vaccinal peut être obtenue par troncage de la protéine non structurale NS1, par introduction de mutations génétiques dans l'HA ou dans les gènes de la polymérase [567]. Ces vaccins, contrairement aux vaccins inactivés (qui sont administrés par voie intramusculaire) sont administrés directement à la muqueuse respiratoire par voie intranasale (IN), cela imite l'infection naturelle et active à la fois les réponses immunitaires mucosales et systémiques [564].

L'un des désavantages des vaccins vivants est le risque d'événements de réassortiment viral. Ce phénomène a été observé avec le vaccin Ingelvac Provenza (Boehringer Ingelheim), le premier

vaccin antigrippal vivant atténué disponible sur le marché pour les porcs. Ce vaccin était autorisé aux États-Unis de 2017 à 2020 pour une utilisation chez les porcs à partir de 1 jour d'âge [574, 575]. Le vaccin s'est avéré efficace pour réduire l'excrétion nasale du virus après l'infection par des souches hétérologues, H1N1 ou H3N2, en présence ou en l'absence d'anticorps d'origine maternelle [576, 577]. Cependant, des études ont révélé l'existence de souches réassortantes contenant des gènes de la souche vaccinale avec des gènes de souches virales de terrain endémiques [574].

Des nouveaux types de vaccins inactivés et atténués, différents des vaccins conventionnels, sont actuellement à l'étude [567]. Il s'agit notamment des vaccins à base d'acides nucléiques [578-582], des vaccins à réplicon [583, 584], des peptides synthétiques [585, 586], des vaccins sous-unitaires [587] et des vaccins à vecteur [588, 589].

L'un des principaux objectifs futurs de la recherche sur les vaccins dirigés contre le virus de l'influenza est la mise au point d'un vaccin « universel » doté de caractéristiques DIVA, c'est-à-dire, qui permet la différenciation des animaux infectés des animaux vaccinés, offrant une protection contre un large éventail de sous-types de virus de l'influenza et permettant une application en masse, par exemple par voie orale [567].

Il est important de mentionner que le contrôle du VIP, ainsi que du VSRRP et du PCV2 peut être compliqué lors des infections mixtes avec ces virus. L'état des connaissances sur les effets des co-infections PCV2/VSRRP et PCV2/VIP est présenté dans la section suivante.

2.5. Les co-infections avec PCV2

Le PCV2 joue un rôle majeur dans le CRP [12]. Il est rarement retrouvé seul chez des porcs malades [590, 591]. L'interaction du PCV2 avec d'autres pathogènes respiratoires a été associée à l'induction d'une immunosuppression, de l'inflammation et du stress du réticulum endoplasmique [592-594]. Des études ont montré que le PCV2 se retrouve le plus souvent en co-infection avec le VSRRP (41%), *M. hyopneumoniae* (27%), des bactéries associées à une septicémie (10%), des bactéries associées à une pneumonie (6%) et le VIP (4%) [4, 595].

La présente étude porte principalement sur les interactions virus-virus impliquant le PCV2/VSRRP et le PCV2/VIP.

2.5.1 La co-infection PCV2/VSRRP

La co-infection PCV2b/VSRRP est signalée comme l'une des combinaisons de pathogène les plus prédominantes retrouvées chez les porcs présentant le syndrome de dépérissement en post-sevrage (SDPS) [17] avec une proportion de co-infection rapportée de 20 % dans l'Ouest canadien [64], 48 % en Espagne [19], 60 % aux États-Unis [20] et 83 % aux Pays-Bas [21]. En plus des porcs atteints de SDPS, le VSRRP a aussi été identifié en association avec le syndrome de dermatite et néphropathie porcine (SDNP) (41%) et avec la pneumonie nécrosante (45%) [590, 591].

Un taux de co-infection PCV2/VSRRP de 42% [590] et jusqu'à 85,4% [22] a été rapporté dans des poumons des porcs présentant des lésions de pneumonie proliférative et nécrosante. Une étude rétrospective réalisée sur des tissus pulmonaires provenant de porcs atteints de CRP a révélé une infection mixte PCV2/VSRRP dans 55 % des cas analysés [12].

L'infection mixte avec le PCV2 et le VSRRP a de multiples implications sur la pathogénèse de chaque virus. Il est rapporté que le PCV2 n'augmente pas la gravité des lésions du VSRRP, mais que le VSRRP augmente la réplication, la virémie et l'excrétion *in vivo* du PCV2 [18] ainsi que la gravité du MACVP [5-9]. En fait, l'infection par le VSRRP est considérée comme un facteur de risque majeur du SDPS chez les porcs infectés par le PCV2 [31].

Puisque le PCV2 et le VSRRP peuvent cibler les cellules immunitaires de l'hôte, l'infection mixte avec ces virus altère les défenses de l'hôte permettant l'infection par d'autres agents pathogènes. Par conséquent, la co-infection PCV2/VSRRP a un impact négatif majeur sur la croissance et les

performances zootechniques des animaux infectés tout en provoquant une augmentation de la morbidité et de la mortalité [596].

Différentes études ont montré les effets immunomodulateurs de la co-infection PCV2/VSRRP. Tsai *et al.* (2012) ont infecté des macrophages alvéolaires porcins (PAM) avec le PCV2 et le VSRRP simultanément et ont observé un taux accru d'IL-8, de TNF- α , d'IFN- α et de transcrits FasL chez les PAMs doublement infectés (quel que soit l'ordre d'infection) par rapport à ceux infectés uniquement par le PCV2 ou le VSRRP [51].

Des études chez des porcs co-infectés ont obtenu un profil d'expression accru de l'IL1 β et des TLR2, 4 et 8, et un effet synergique négatif sur l'expression de l'ARNm des TLR 3, 7 et 9, A20, Bcl-3, IRAK-M, MKP-1, SARM1 et SIGIRR, ainsi que de l'IRF-1, IRF-3, IFN- α et TNF- α [597, 598]. Park *et al.* (2014) ont signalé des taux plus faibles d'anticorps IgG anti-PCV2 et anti-VSRRP chez les porcs doublement infectés que chez les porcs infectés avec un seul virus, indépendamment du génotype viral (PCV2a ou PCV2b et VSRRP-1 ou VSRRP-2) [6]. De plus, il a été rapporté que la co-infection PCV2/VSRRP diminuerait le nombre total et différentiel de leucocytes chez le porc [5]. Des études de co-culture de cellules dendritiques (DC) co-infectées avec le PCV2 et le VSRRP ou infectées par un seul virus, avec de lymphocytes de porc ont montré que la co-infection induirait un nombre significativement plus élevé de T(regs) dans le cas de la co-infection comparativement à l'infection par un seul virus [599]. Cette activation des Tregs peut atténuer les réponses immunitaires au PCV2, ce qui entraînerait une augmentation de la réplication de ce virus et de la maladie clinique [599].

De plus, une augmentation des taux de mutation du VSRRP [600], de même qu'une réduction de l'efficacité des vaccins contre le VSRRP ont été rapportées lors d'une co-infection PCV2/VSRRP [431].

2.5.2 La co-infection PCV2/VIP

Les infections mixtes au PCV2 et VIP sont fréquentes chez les porcs [4, 18, 23, 24]. Au cours de l'analyse de 636 cas positifs au VIP recueillis au Laboratoire de diagnostic vétérinaire du Minnesota entre janvier 2000 et juin 2001, une co-infection avec le PCV2 a été retrouvée dans 54 des échantillons (8,5 %) [2]. En outre, une étude épidémiologique réalisée par Dorr *et al.* (2007)

a conclu que l'infection par le VIP de type A était plus probable de survenir chez les porcs infectés par le PCV2 que chez les porcs non infectés par ce virus [23].

De plus, dans une ferme où le PCV2 et le VIP étaient en co-circulation, il a été observé que la mortalité atteignait 10 % chez les porcs co-infectés et que 5 % des porcs co-infectés n'atteignaient pas le poids du marché [601].

Les effets de la co-infection PCV2/VIP sont peu connus, probablement parce que l'interaction des deux virus a été moins étudiée [18, 50]. Wei *et al.* (2010) ont inoculé expérimentalement des porcs avec le PCV2 uniquement ou conjointement avec le VIP pour déterminer si le VIP influençait la réplication et la pathogénèse du PCV2 [10]. Les résultats de l'étude ont démontré que la co-infection avec le VIP n'augmentait pas le nombre de copies génomiques du PCV2 dans le sérum ou les tissus cibles, ni les lésions microscopiques associées au PCV2 dans les poumons et les noeuds lymphatiques. Le titre d'anticorps contre le PCV2 chez les animaux doublement infectés n'était pas augmenté également. Cependant, l'infection par le PCV2 a augmenté la maladie clinique liée au VIP, car les animaux co-infectés présentaient une affection respiratoire plus sévère, comparativement aux animaux mono-infectés au PCV2. Toutefois, l'impact du PCV2 sur l'infection par le VIP n'a pas été élucidé dans cette étude [10]. Une étude réalisée par Huang *et al.* (2021) a montré que l'infection par le VIP diminuerait les réponses immunitaires protectrices d'un vaccin sous-unitaire contre le PCV2 chez la souris. Ces résultats suggèrent que l'infection par le VIP pourrait accroître le risque d'échec de la vaccination contre le PCV2 [43]. Néanmoins, les réponses à la vaccination contre le PCV2 chez des porcs infectés par le VIP n'a pas encore été étudié. À ce jour, plusieurs aspects de la pathogénèse de la co-infection PCV2/VIP demeurent inconnus [4, 18, 50].

Afin de mieux comprendre le possible impact des co-infections PCV2/VSRRP et PCV2/VIP au niveau cellulaire, il est nécessaire de comprendre les différents types d'interactions virus-virus et virus-cellule hôte qui ont été décrits.

2.6 Les interactions virales et leurs rôles dans l'infection virale et la réponse de la cellule infectée

2.6.1 Les interactions virus-virus

La recherche sur la pathogenèse virale en laboratoire implique généralement l'étude des virus en l'absence d'autres pathogènes, cependant, dans la nature, les virus sont généralement détectés en co-infection avec d'autres pathogènes, soit bactériens ou viraux [1, 46, 48]. Comprendre les interactions virus-virus est essentiel pour comprendre la pathogenèse virale dans des conditions plus réalistes.

Les interactions virus-virus (VVI : virus-virus interactions) sont définies sur la base des différences mesurables dans l'évolution de l'infection d'un virus à la suite d'une infection concomitante ou antérieure par une espèce ou une souche de virus différente [602]. L'infection par deux virus ou plus peut avoir lieu dans une même cellule. De plus, différents virus peuvent infecter différents types de cellules au sein d'un organisme et produire des VVI mesurables [18, 20, 541, 599, 603].

Lors de co-infections virales, il peut y avoir de l'antagonisme (interférence virale), de la neutralité ou de la synergie entre les agents infectieux. Ces interactions peuvent avoir un impact sur le tropisme cellulaire, la réplication et la pathogenèse, ainsi que sur les fonctions cellulaires et leurs réponses envers l'infection virale [18, 604]. La synergie entre les virus pourrait entraîner une aggravation de la maladie, en raison de la combinaison des effets cytopathiques viraux affectant l'hôte de manière négative [7, 602].

Une classification des VVI a été proposée par Da Palma *et al.* (2010) [602]. Les auteurs ont divisé les VVI en 3 catégories: directe, indirecte et immunologique. Les interactions directes se produisent lorsque les acides nucléiques ou les protéines d'un virus interagissent physiquement avec les gènes ou les produits géniques d'un second virus co-infectant. Ce type d'interaction requiert la co-infection de la même cellule, mais pas nécessairement au même temps.

Le deuxième type d'interactions (indirectes ou environnementales) résultent d'altérations de l'environnement de la cellule hôte par des co-infections préexistantes ou simultanées. Ces interactions peuvent impliquer la transactivation indirecte des gènes (comme les facteurs de transcription cellulaire qui peuvent favoriser la co-infection des virus), la rupture des barrières

physiques de l'hôte contre l'infection, l'altération de l'expression des récepteurs, l'activation hétérologue des pro-drogues antiviraux et la modification de l'état antiviral induit par l'interféron. Pour que ce type d'interaction ait lieu, les virus infectieux doivent se chevaucher dans le temps.

Le troisième type de VVI (immunologique) est un type d'interaction indirecte impliquant le système immunitaire adaptatif. Contrairement aux interactions environnementales, des interactions immunologiques peuvent se produire entre des infections virales qui sont complètement séparées dans le temps. Dans ce cas, la réponse immunitaire induite par une infection peut avoir une incidence sur l'issue d'une infection virale subséquente [605].

2.6.2 Les interactions virus-cellule hôte

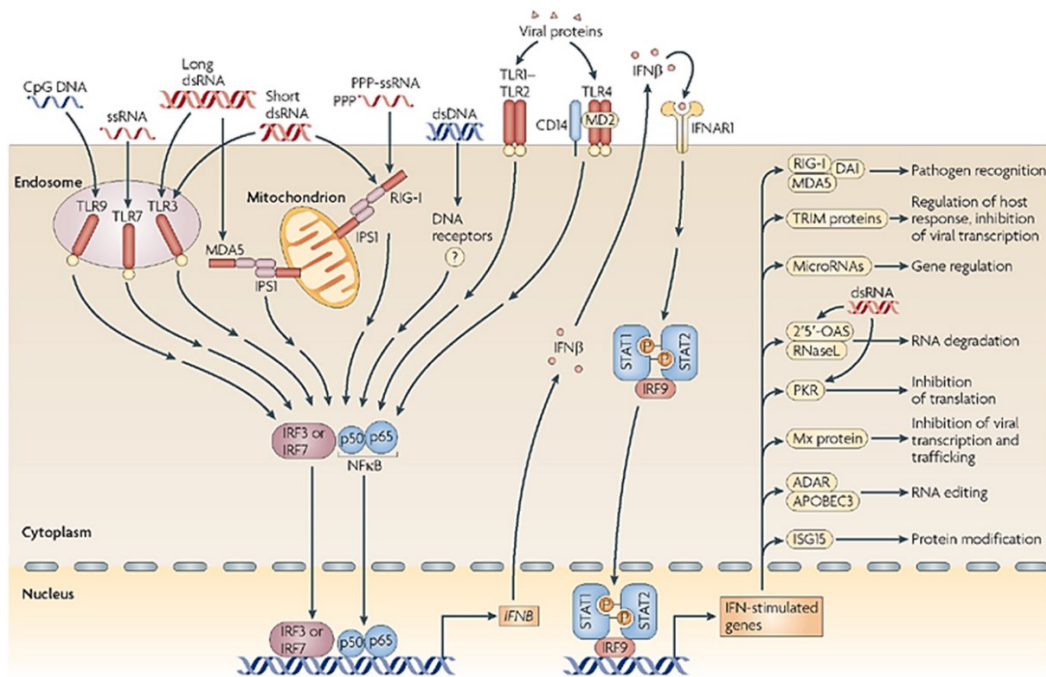
Comprendre les interactions dynamiques entre un virus et son hôte est important pour comprendre les mécanismes à l'origine de l'établissement d'infections aiguës, du maintien d'infections persistantes et de l'induction de la maladie. Ces interactions conduisent à l'activation ou à l'inhibition de voies cellulaires complexes, ce qui entraîne des effets variables sur les réponses antivirales et par conséquent sur la réplication du virus et sa pathogenèse [606].

2.6.2.1 Détection des virus par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

Les virus sont reconnus par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) exprimés dans les cellules de l'hôte, telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les cellules épithéliales [607]. Il existe différentes familles de PRRs qui sont classées en fonction de leur localisation de la manière suivante 1) les PRR liés à la membrane, y compris les récepteurs de type Toll (TLR) et les récepteurs de lectine de type C (CLR) et 2) les PRR cytoplasmiques qui comprennent les récepteurs de type NOD (NLR) et les récepteurs de type RIG-I (RLR) [608, 609].

Les virus sont détectés par différents membres de la famille des TLR. Treize TLRs ont été identifiés chez les mammifères [610]. Chez les porcs, 10 gènes codent pour les TLRs (TLR1 à TLR10) [611]. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10 sont situés sur la membrane cellulaire, tandis que TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont situés dans des vésicules intracellulaires où ils détectent les acides nucléiques [607, 612]. TLR3 détecte l'ARN double brin (ARNds), ce qui constitue le génome de

certain virus mais qui est également généré au cours du cycle de réplication de nombreux virus à ARN. TLR7 et TLR8 reconnaissent l'ARN simple brin (ARNss) et TLR9 reconnaît l'ADN non méthylé contenant des îlots CpG. Il a été démontré que TLR2 et TLR4 peuvent détecter des protéines virales telles que les glycoprotéines d'enveloppe [613, 614]. Les virus à ARN sont également détectés par les récepteurs de type RIG-I (RLR), qui reconnaissent les ARNs générés lors de la réplication virale [607] (Figure 12).



Nature Reviews | Immunology

Figure 12. – Activation de la réponse interféron déclenchée par la détection de motifs moléculaires associés à des pathogènes viraux. Tiré de [607]. © Nature Publishing Group 2008. Permission accordée.

La détection des virus par les PRR conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans les réponses immunitaires innées contre l'infection virale.

Cependant, un virus peut interagir avec les protéines de la cellule hôte et moduler les voies cellulaires pour inhiber les réponses antivirales et favoriser sa réplication [607]. Il a été démontré

que la protéine nsp11 du VSRRP et la protéine NS1 du VIP suppriment la voie de signalisation RIG-I pour antagoniser la production des IFNs de type I [615-618].

Outre les voies de signalisation TLR/RIG-I, d'autres mécanismes de défense cellulaire et des voies de signalisation sont modulés par les virus pour faciliter l'infection, notamment, les voies de l'apoptose, la signalisation NF- κ B, la signalisation PI3K/AKT, la cascade des MAPK et l'autophagie. L'infection par les virus étudiés dans le cadre de ce projet de doctorat (le PCV2, le VSRRP et le VIP) provoque inexorablement une modulation de ces voies de signalisation cellulaires [132, 619-633]. Par conséquent, lors d'une co-infection virale, leur pathogénèse virale pourrait fortement être modifiée.

2.6.2.2 La mort cellulaire

La mort cellulaire est fréquemment induite après une infection virale et peut être observée, notamment, sous trois formes différentes : l'apoptose, la nécroptose et la pyroptose. Ces différents mécanismes de mort cellulaire peuvent limiter la réplication du virus, mais dans certains cas, ils favorisent la dissémination du virus et contribuent aux lésions tissulaires, exacerbant la maladie virale [634].

Il est connu que le PCV2 induit l'apoptose mais pas la pyroptose ou la nécroptose [635]. En revanche, il a été rapporté que le VSRRP induisait la nécroptose et la pyroptose *in vitro* et *in vivo* [636]. Les études de Sánchez-Carvajal *et al.* ; 2021, mettent en évidence l'induction de la nécroptose et de la pyroptose au cours de la première semaine après l'infection par le VSRRP suivie de l'activation de l'apoptose au cours de la deuxième semaine post-infection [636].

En ce qui concerne le VIP, lors de l'infection par ce virus, l'apoptose, la nécroptose ainsi que la pyroptose peuvent être induites en parallèle, un mécanisme appelé PANoptose [637]. La PANoptose est reconnue comme une voie de mort cellulaire liée à la réponse immunitaire et inflammatoire innée, régulée par les complexes PANoptosomes [638]. Cependant, les détails moléculaires de la formation et de la dissociation des complexes PANoptosomes lors de l'infection par le VIP ne sont pas bien compris [637].

L'apoptose a été impliquée dans l'infection par les trois virus de la présente étude. C'est pourquoi les caractéristiques de l'apoptose seront revues plus en détail, ainsi que les mécanismes

développés par le PCV2, le VSRRP et le VIP pour moduler cette voie de mort cellulaire afin de favoriser l'infection.

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus cellulaire essentiel pour le contrôle homéostatique de la croissance cellulaire, pour l'élimination des cellules endommagées et est une réponse immunitaire cellulaire face aux agents pathogènes envahisseurs [639]. L'apoptose se produit via 3 voies, les deux voies les plus connues sont la voie intrinsèque ou mitochondriale et la voie extrinsèque ou de récepteur de mort. La troisième voie est la voie perforine/granzyme [639, 640].

La voie intrinsèque est activée principalement par les dommages à l'ADN, le stress du réticulum endoplasmique, le stress métabolique, le rayonnement UV, la privation de facteurs de croissance, l'oxyde nitrique et l'infection par des agent pathogènes. Ces facteurs modifient la perméabilité de la membrane mitochondriale, ce qui conduit à la libération du cytochrome c [641]. Lors de sa libération, le cytochrome c se lie au facteur 1 d'activation de la protéase apoptotique (APAF-1) et à l'ATP pour former un complexe avec la pro-caspase 9, cette dernière est alors clivée en sa forme active, la caspase 9 [642]. Le contrôle et la régulation de la voie apoptotique mitochondriale impliquent des membres de la famille des protéines Bcl-2. Ils régulent la perméabilité de la membrane mitochondriale et ses effets peuvent être pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques [641, 643]

La voie extrinsèque ou des récepteurs de mort implique l'activation des membres de la sous-famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF), tels que TNFR1, CD95/Fas ou TRAILR (récepteurs de la mort), situés à la surface cellulaire, par leurs ligands spécifiques, TNF-alpha, FasL ou TRAIL, respectivement. Cela déclenche une cascade d'événements qui culminent vers la mort cellulaire [644]. L'initiation de la voie extrinsèque de l'apoptose est médiée par la caspase 8 [645].

La voie perforine/granzyme est une voie utilisée par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK (tueuses naturelles) pour éliminer les cellules infectées par les virus ou les cellules tumorales [646], grâce aux granules cytotoxiques (par exemple Perforin et Granzyme B) qui sont libérés par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK [647].

Chaque voie, extrinsèque, intrinsèque et perforine/granzyme utilise respectivement sa propre caspase initiatrice, caspase-8, caspase-9 et caspase-10, respectivement, qui à son tour activeront

par protéolyse les caspases exécutrices 3 et 7 [639]. Cependant, il est connu que la voie perforine/granzyme peut également induire l'apoptose via la granzyme A d'une manière indépendante des caspases [648].

Les caspases exécutrices activent des endonucléases cytoplasmiques, qui dégradent le contenu génétique nucléaire, et les protéases qui dégradent les protéines nucléaires et les protéines du cytosquelette. Les caractéristiques cytomorphologiques de l'apoptose comprennent le rétrécissement cellulaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, la formation de bulles cytoplasmiques et de corps apoptotiques [649]. C'est l'équilibre entre les signaux pro-apoptotiques et anti-apoptotiques qui détermine finalement si les cellules subiront l'apoptose, survivront ou proliféreront [639].

L'apoptose permet de limiter la réplication et la propagation virales en éliminant les cellules infectées [650]. Cependant, les virus ont développé des stratégies pour induire ou inhiber l'apoptose afin de favoriser leur survie et la persistance de l'infection [650, 651].

Le PCV2 peut à la fois induire ou inhiber l'apoptose au cours du cycle viral [652]. Dans les cellules PK15, le virus peut supprimer l'apoptose au stade précoce de l'infection pour favoriser la réplication virale, en induisant la voie PI3K/AKT [653]. Dans les macrophages alvéolaires porcins (PAM), l'expression de SERPINB9, un inhibiteur de sérine protéinases impliqué dans la protection contre l'apoptose médiée par la granzyme B, est augmenté lors de l'infection par le PCV2 afin de prévenir l'apoptose [654]. De plus, il a été rapporté que le gène ORF4 du PCV2 peut supprimer l'activité des caspases [655].

D'autre part, le PCV2 induit des mécanismes pro-apoptotiques durant les derniers stades de l'infection pour favoriser la libération et la dissémination des virions. Le virus induit l'apoptose en activant le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) via la phosphorylation et la dégradation de I κ B α [621]. Également, le PCV2 peut induire l'apoptose via la phosphorylation de la kinase régulatrice du signal de l'apoptose 1 (ASK1) et subséquentement l'activation des voies de la protéine Janus kinase 1/2 (JNK1/2) et des protéines kinases activées par les mitogènes p38 (MAPK P38) [656].

Plusieurs études ont montré que le PCV2 déclenche le stress du réticulum endoplasmique et la réponse aux protéines non repliées (UPR : unfolded protein response) dans les cellules PK-15 [657] et les macrophages alvéolaires porcins (PAM) infectées [658]. Le stress du réticulum

endoplasmique résulte de l'accumulation de protéines mal repliées ou dépliées dans le réticulum endoplasmique. Pour atténuer ce processus, la voie de signalisation appelée UPR est activée. L'UPR atténue le stress du réticulum endoplasmique en réduisant la synthèse des protéines, en augmentant la capacité de repliement des protéines et en éliminant certaines des protéines dépliées. Cependant, si les conditions de stress du réticulum endoplasmique persistent, l'UPR déclenche l'apoptose [659]. Le stress du réticulum endoplasmique induit par PCV2 est dépendant de la protéine virale Cap et implique l'altération de l'homéostasie intracellulaire du Ca^{2+} ainsi que l'activation de la voie PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), ce qui déclenche finalement l'apoptose [660]. De plus, il a été rapporté que le gène ORF3 du PCV2 inhibe l'ubiquitination et l'inactivation de p53, ce qui conduit à l'accumulation de p53 et provoque l'apoptose [661].

Le VSRRP, quant à lui, empêche initialement la mort cellulaire dans les PAM, tandis que l'apoptose est induite à la fin de l'infection, causant la mort de la cellule [662]. Il a été suggéré que l'induction de l'apoptose au cours de l'infection par le VSRRP joue un rôle dans la pathogenèse virale [663]. L'infection par le VSRRP augmente l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax, suivi de la perturbation du potentiel de la membrane mitochondriale, de la libération du cytochrome c et de l'activation subséquente de la caspase-9 [664]. D'autres études ont montré que la diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xl, l'augmentation de la protéine pro-apoptotique Bim, ainsi que l'augmentation du taux de formes réactives de l'oxygène (ROS) contribuent à l'apoptose induit par le VSRRP [664, 665]. La voie extrinsèque est également activée via l'expression accrue de TNFR1 et FasL en réponse à l'infection par le VSRRP [666].

Parmi les protéines du VSRRP induisant l'activation de l'apoptose se trouvent la protéine E, laquelle serait responsable d'une surexpression de la caspase 3 lors de l'infection [667], ainsi que la protéine nsp4, laquelle manipule les fonctions pro- ou anti-apoptotique des protéines de la famille Bcl-2 pour faciliter l'induction de l'apoptose [665].

Des études précédentes ont indiqué que le VSRRP peut également induire le stress du réticulum endoplasmique et activer l'UPR [663]. L'induction de l'UPR contribue non seulement à l'apoptose induite par le VSRRP dans les cellules hôtes, mais est également impliquée dans la régulation de la réplication virale et de la dérégulation de la production de cytokines dans les PAM [668, 669].

Comme le PCV2 et le VSRRP, le VIP inhibe l'apoptose pendant la phase initiale de l'infection en régulant positivement la voie anti-apoptotique PI3K/AKT, tandis que dans la phase tardive de l'infection, le virus supprime cette voie et régule positivement la voie p53 pro-apoptotique [620]. Certaines études ont mis en évidence les propriétés pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la protéine NS1 du virus de l'influenza [670, 671]. D'autres protéines du virus de l'influenza ont été également impliquées dans la modulation de l'apoptose y compris: la nucléoprotéine (NP), la neuraminidase (NA), PB1-F2, les protéines M1 et M2 et la protéine PA-X [475, 672-676].

2.6.2.3 Signalisation NF- κ B

NF- κ B est un facteur de transcription hautement conservé et inductible, qui régule l'expression de plus de 200 gènes, qui à leur tour contrôlent le statut cellulaire des gènes codant pour les cytokines / chimiokines, les molécules d'adhésion et les gènes anti / pro-apoptotiques. La voie NF- κ B/I κ B joue ainsi un rôle vital dans la médiation de l'inflammation, de la réponse immunitaire, de la différenciation, de la prolifération, de la survie cellulaire et de l'apoptose [677].

Cinq protéines monomériques structurellement liés composent les différentes formes d'NF- κ B, à savoir RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50) et NF- κ B2 (p52). Ces protéines forment une variété d'homo- et d'hétérodimères selon leurs différents états d'activation. L'hétérodimère de p65 et p50 est le dimère le plus retrouvé dans les cellules, il est communément connu sous le nom de complexe NF- κ B [678]. NF- κ B est présent sous forme de complexe avec son inhibiteur (famille I κ B) dans le cytoplasme. I κ B α ou I κ B β se lie sélectivement au complexe NF- κ B, ce qui masque son signal de localisation nucléaire (NLS), empêchant ainsi sa translocation nucléaire. L'activation de cette voie est associée à la localisation intranucléaire du complexe NF- κ B [677, 678].

Pendant l'infection par le PCV2, il y a translocation de p65 vers le noyau, phosphorylation de I κ B α et activation de la voie NF- κ B. La voie NF- κ B activée favoriserait davantage la réplication du virus et l'apoptose induite par le PCV2 [621]. Certaines études ont démontré que l'infection par le VSRRP pouvait activer la voie NF- κ B dans les cellules MARC-145 et les macrophages alvéolaires. L'activation de NF- κ B par le VSRRP semble être médiée, au moins en partie, par la dégradation de I κ B α dans les cellules MARC-145, tandis que dans les cellules PAM, l'activation de cette voie est médiée par la dégradation de I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ [622]. Les protéines N et Nsp2 du VSRRP se sont révélées être des activatrices de NF- κ B [679, 680] tandis que Nsp1 α , Nsp1 β et Nsp11

fonctionnerait comme régulateurs négatifs de cette voie, permettant au virus d'échapper à la réponse immunitaire innée de l'hôte [616, 681, 682]. Ces observations suggèrent que le VSRRP peut activer ou inhiber la voie NF- κ B pour survivre dans les cellules hôtes.

Il a été rapporté que l'activation de la voie NF- κ B n'est pas essentielle pour une réplication virale efficace, mais qu'elle pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse du VSRRP. En fait, certaines études ont démontré que le VSRRP augmentait l'expression de l'ARNm de MMP-2 et MMP-9 en utilisant la voie NF- κ B, ce qui a été corrélé à l'apparition de lésions pulmonaires histologiques graves chez des porcs infectés par le VSRRP [622, 683].

Dans le cas du virus de l'influenza, l'activation de la voie NF- κ B est une condition essentielle à l'infection et à la réplication virale. Il a été montré que l'inhibition de cette voie bloquait l'infection virale et que les cellules ayant une faible activité NF- κ B étaient peu sensibles à l'infection par le virus de l'influenza [684, 685].

Certaines études indiquent que la surexpression des protéines virales HA, NP et M1 peut être responsable de l'activation de la voie NF- κ B [623, 624]. L'activation de cette voie entraîne le déclenchement de la réponse immunitaire de l'hôte, y compris la production d'IFN. Également, la protéine NS1 jouerait un rôle important en tant qu'antagoniste de la réponse de l'IFN de l'hôte [686].

2.6.2.4 Signalisation PI3K/AKT

Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) sont des kinases lipidiques hétérodimériques qui jouent un rôle central dans la régulation des fonctions cellulaires essentielles. La cible en aval la plus connue pour PI3K est la kinase AKT qui régule divers processus cellulaires, tels que la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation, la transcription, la traduction et l'apoptose [687].

AKT peut inhiber l'apoptose via la phosphorylation inhibitrice de certaines protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bad et la caspase-9 [688-690]. De plus, AKT active certains facteurs de transcription qui, à leur tour, régulent à la hausse les gènes anti-apoptotiques, tels que CREB, I κ B, Bcl-2 et MDM2 [690].

L'interaction des virus et des protéines virales avec la voie de signalisation PI3K/AKT au cours des différentes étapes du cycle viral peut faciliter la réplication virale. Il a été rapporté que l'activation

de la voie PI3K/AKT au début de l'infection par le PCV2 favorise la survie cellulaire ainsi que la réplication virale [653], tandis que la suppression de l'activité PI3K entraîne une réduction de la réplication de ce virus [653].

Il a été démontré que l'infection par le VSRRP déclenche l'activation de FAK, PI3K, AKT et Rac1 [691]. FAK est une tyrosine kinase qui peut phosphoryler la sous-unité p85 de PI3K et activer par la suite la voie de signalisation PI3K/AKT. Rac1, quant à lui, est un régulateur important du remodelage de l'actine. L'activation de la voie de signalisation FAK-PI3K-AKT-Rac1 par le VSRRP conduirait à une réorganisation du cytosquelette d'actine ce qui facilite l'internalisation du virus [691]. L'activation d'AKT par le VSRRP provoque l'inhibition de l'apoptose dans les cellules hôtes au début de l'infection, ce qui facilite la réplication virale [663].

La voie de signalisation PI3K/AKT est également activée suite à l'infection par le virus de l'influenza [542]. L'activation de la voie PI3K/AKT via la liaison de NS1 à la sous-unité p85 conduit à la suppression de la mort cellulaire, facilitant ainsi la réplication virale [692, 693].

2.6.2.5 Signalisation MAPK

Les cascades de protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) sont des voies de transduction du signal intracellulaire conservées impliquées dans la conversion de divers signaux extracellulaires en réponses cellulaires, notamment la croissance, la prolifération, la différenciation, la motilité, la réponse au stress, la survie et l'apoptose [694]. Quatre sous-groupes distincts de la famille des MAPK ont été identifiés: 1) Les kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERK), 2) le p38 MAPK, 3) les c-jun N-terminales ou protéines kinases activées par le stress (JNK / SAPK) et 4) ERK5 / Big MAP kinase 1 (BMK1) [695].

La signalisation MAPK peut favoriser ou restreindre la réplication des virus. Wei *et al.* (2009) ont démontré que l'activation des voies JNK/SAPK et p38 MAPK est essentielle pour une réplication efficace du PCV2. Cela a été mis en évidence par le fait que l'inhibition de ces deux voies réduisait la transcription de l'ARNm viral et la synthèse des protéines, la libération de nouveaux virions et l'activité apoptotique des caspases induites par le PCV2 [696]. Ces auteurs ont aussi montré que la voie de signalisation ERK est également impliquée dans l'infection par le PCV2 et favorise la réplication du virus dans les cellules en culture [697].

La voie JNK est activée également après l'infection par le VSRRP via la génération de ROS et l'induction du stress du réticulum endoplasmique [668]. Des études réalisées en utilisant l'inhibiteur spécifique du JNK, SP600125, ont mis en évidence que l'activation de la voie de signalisation JNK est essentielle pour l'induction de l'apoptose médiée par le VSRRP, mais pas pour la réplication virale [698]. Il a été rapporté que l'activation de la voie JNK par le VSRRP contribue également à l'induction de la production de cytokines [699]. D'autre part, il a été rapporté que l'inhibition de l'activation de la voie ERK avec l'inhibiteur de ERK1/2, U0126, entraîne une réduction significative de la synthèse de l'ARNm sg viral, de l'expression des protéines virales et de la libération de nouveaux virions [700]. Cela indique que l'activation ERK est nécessaire pour une réplication efficace du VSRRP.

L'infection par le virus de l'influenza cause une activation des quatre membres de la famille des MAPK [542]. L'activation des voies des MAPK régule positivement plusieurs étapes de la réplication du virus de l'influenza, notamment la synthèse de l'ARN, l'exportation et la libération (bourgeonnement) des nouveaux virus produits, l'endocytose et l'internalisation indépendantes de la clathrine, l'exportation nucléaire et la synthèse des protéines virales [629].

2.6.2.6 Autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire catabolique conservé chez tous les eucaryotes qui implique la dégradation et le renouvellement des composants cytoplasmiques (protéines macromoléculaires et organelles endommagés) par fusion lysosomale [701]. L'autophagie agit également comme un mécanisme de défense de la cellule hôte contre les virus, en les enveloppant dans l'autophagosome [702, 703]. Cependant, les virus, quant à eux, peuvent réguler le processus d'autophagie pour faciliter les différentes étapes du cycle de réplication virale [703].

Certaines études ont démontré que le produit du gène ORF5 du PCV2 induit l'autophagie dans les cellules PK-15, ce qui favorise à son tour la réplication virale [630]. D'autres études ont signalé que la protéine porcine DNAJB6, qui est un membre de la famille des protéines Hsp40/DnaJ, induit l'autophagie pendant l'infection par le PCV2, en interagissant avec la protéine virale Cap, ce qui favoriserait la réplication du virus [704].

L'infection par le VSRRP induit l'autophagie dans les cellules MARC-145 et les macrophages alvéolaires, conduisant à une réplication accrue du virus [632, 705]. Il a été montré que les

inhibiteurs de la formation d'autophagosomes comme la 3-méthyladénine (3-MA) entraînent une diminution de la charge du VSRRP dans les cellules [632], ce qui corrobore le fait que l'induction de l'autophagie favorise la réplication du VSRRP. Fait intéressant, Wang *et al.* (2015) ont rapporté que la souche HP-VSRRP HuN4 peut induire l'autophagie dans les cellules infectées mais aussi dans les cellules voisines non infectées (bystander) dans le thymus des porcelets infectés [706]. L'induction de l'autophagie a également été observée au cours de l'infection par le virus de l'influenza. Les protéines virales NP et M2 induisent l'autophagie en inhibant la voie de signalisation AKT-mTOR et en augmentant l'expression de HSP90AA1 [707]. Les protéines HA et NS1 ont également été impliquées dans l'initiation de la formation d'autophagosomes dans les cellules infectées [708]. L'induction de l'autophagie par le virus de l'influenza favorise la réplication virale en augmentant l'interaction de PB2 et HSP90AA1, l'exportation de vRNP et la formation de particules virales infectieuses dans les cellules hôtes [708].

L'activité autophagique implique la formation d'autophagosomes à double membrane qui, après fusion avec un lysosome, aboutit à un autolysosome. L'autolysosome dégrade ensuite, le contenu autophagique [709]. Il a été démontré que les virus H1N1 et H3N2 induisent l'accumulation d'autophagosomes et bloquent la formation d'autolysosomes. Cela a un impact négatif sur l'activité antivirale autophagique de la cellule [710].

L'induction de l'autophagie au cours de l'infection par le virus de l'influenza peut provoquer une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou l'activation des voies de signalisation NF- κ B et p38 MAPK. Cela peut conduire à une inflammation excessive et à une exacerbation des lésions pulmonaires aiguës [711, 712]. De plus, il a été observé que l'autophagie induite par le virus de l'influenza limite la signalisation médiée par l'IFN- β et réduit l'expression des gènes stimulés par l'interféron, favorisant ainsi l'infection virale [633].

Chapitre 3 - Problématiques

Les infections avec le PCV2, le VSRRP et le VIP sont très fréquentes dans le cadre du CRP [1]. Les co-infections du PCV2 avec le VSRRP ou le VIP sont souvent associées à une maladie respiratoire plus sévère avec de lourdes pertes économiques pour les producteurs [6, 10, 43-45].

Des nombreuses études montrent que les interactions du PCV2, le VSRRP et le VIP avec leur cellule hôte peuvent conduire à la modulation de l'expression des gènes cellulaires et à l'activation ou à l'inhibition de voies cellulaires. Ces interactions (virus-cellule hôte) peuvent avoir un impact sur les réponses antivirales et par conséquent sur la réplication de ces virus dans les cellules infectées [542, 620-624, 629, 630, 632, 633, 652, 653, 662, 668, 683, 691, 697, 705].

Les effets et les mécanismes impliqués pendant une co-infection PCV2b/VSRRP dans les cellules épithéliales respiratoires porcines ont été très peu étudiés. D'autre part, les effets et les mécanismes impliqués lors de la co-infection PCV2b/VIP dans différents modèles de cellules respiratoires porcines demeurent inconnus.

Chapitre 4 - Hypothèse et objectifs de recherche

4.1 L'hypothèse

L'hypothèse de ce projet de recherche est que les co-infections PCV2b/VSRRP et PCV2b/VIP influencent la réplication de chaque virus *in vitro*, ainsi que les réponses de la cellule hôte face aux infections virales. Les variations observées de la réplication des virus lors des co-infections pourraient être expliquées par la modulation de l'expression de gènes spécifiques et de voies cellulaires impliquées dans l'infection virale.

4.2 Les objectifs de recherche

L'**objectif général** de cette étude est de caractériser les effets viraux induits dans des cellules infectées et d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la réplication virale lors de co-infections avec les principaux virus respiratoires porcins. Pour accomplir cet objectif, deux objectifs spécifiques avec différents sous-objectifs sont proposés :

1. **Élucider les mécanismes de la pathogenèse de la co-infection PCV2b/VSRRP**

1.1. Valider l'effet de la co-infection PCV2b/VSRRP sur la réplication virale dans un modèle de cellules épithéliales respiratoires porcines.

1.2. Caractériser l'effet de la co-infection PCV2b/VSRRP sur la réponse cellulaire, notamment, la viabilité cellulaire, la modulation de l'expression des ARNm de cytokines et de l'expression des gènes et des voies de signalisation cellulaires.

1.3. Confirmer la modulation de l'expression du gène DUSP1 (identifié au point 1.2) et évaluer son rôle sur la réplication virale lors de la co-infection PCV2b/VSRRP.

2. **Élucider les mécanismes de la pathogenèse de la co-infection PCV2b/VIP**

2.1. Déterminer l'effet de la co-infection PCV2b/VIP sur la réplication virale dans différents modèles cellulaires des voies respiratoires porcines.

2.2. Caractériser l'effet de la co-infection PCV2b/VIP sur la réponse cellulaire, notamment, la viabilité cellulaire, la modulation de l'expression des ARNm de cytokines et de l'expression des gènes et des voies de signalisation cellulaires.

Chapitre 5 - Résultats

5.1 Premier article. *DUSP1* mRNA modulation during porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-infection regulates viruses replication

Cet article dont nous sommes sept auteurs a pour but de déterminer l'effet de la co-infection PCV2b/VSRRP sur la réplication virale et les réponses de la cellule hôte dans un modèle de cellules épithéliales respiratoires porcines (NPTr-CD163). De plus, l'étude vise à élucider le rôle du gène *DUSP1* (qui a été préalablement identifié durant les travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat), sur la réplication virale.

Cet article a été soumis pour publication au journal Virus Research le 2 août 2023 (numéro de manuscrit: VIRUS-D-23-00394.)

Contributions individuelles :

Yaima Burgher : Élaboration de tous les protocoles, acquisition, analyse et interprétation de tous les résultats, rédaction du manuscrit (brouillon initial et version finale)

Dr Chantale Provost : Conception des protocoles, optimisation de la préparation et du séquençage des librairies, révision du manuscrit.

Dr Fernando Alvarez : Optimisation des protocoles et des infections virales.

Europa Meza et Dr Christopher A. Price : Optimisation et développement des tests d'immunobuvardage de type Western (Western blot).

Marie-Jeanne Pesant : Production du VSRRP, analyse des données de séquençage et révision du manuscrit.

Dr Carl A. Gagnon : Conception du projet et des expériences, acquisition du financement, interprétation des résultats, révision du manuscrit.

***DUSP1* mRNA modulation during porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-infection regulates viruses replication**

Yaima Burgher Pulgaron^a, Chantale Provost^b, Fernando Alvarez^d, Europa Meza^c, Marie-Jeanne Pesant^a Christopher A. Price^c and Carl A. Gagnon^{a, b*}

^aThe Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA-FRQNT), Faculté de médecine vétérinaire (FMV), Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 2M2.

^bMolecular diagnostic laboratory, Centre de diagnostic vétérinaire de l'Université de Montréal (CDVUM), FMV.

^cCentre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, J2S 7C6, QC, Canada

^dInfectious diseases and Immunity in Global Health (IDIGH), McGill University, 1001 Décarie, Montréal, Québec, Canada, H4A 3J1

*Corresponding author email address: carl.a.gagnon@umontreal.ca

3200 Sicotte, bureau 3963, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 2M2, Canada

Abstract

The effects of porcine circovirus type 2b (PCV2b) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) co-infection in epithelial cells of the swine respiratory tract is unknown. In the present study, the newborn pig trachea cell line NPTr-CD163, which is permissive to both viruses, was persistently infected with PCV2b and then with PRRSV. The viral replication, cell viability, cytokines' mRNA expression, and modulation of cellular genes expression were evaluated in infected cells. In NPTr-CD163 co-infection model, PCV2b replication was enhanced while PRRSV replication was suppressed. Cell viability was significantly decreased during PCV2b single infection and co-infection compared to mock-infected and PRRSV single infected cells. However, no difference was observed in cell viability between PCV2b and PCV2b/PRRSV infected cells. The *IL6*, *IL8* and *IL10* mRNA expression was significantly higher in co-infected cells compared to PCV2b and PRRSV single infected cells. Moreover, the *IFN- α/β* expression was significantly reduced in co-infected cells compared to PCV2b infected cells whereas it remained higher compared to PRRSV infected cells. The differential gene expression analysis revealed that the mRNA expression level of the cellular gene *DUSP1* was significantly higher in all PRRSV infection models compared to PCV2b single infected cells. Knockdown of *DUSP1* expression in co-infected cells significantly reduced PCV2b replication, suggesting a role for *DUSP1* in PCV2b/PRRSV pathogenesis.

Key words: PCV2b, PRRSV, co-infection, NPTr-CD163 cells, *DUSP1*

1. Introduction

Swine respiratory diseases have a huge impact on this industry (Brockmeier *et al.* 2002). One of the issues that make it difficult to control respiratory problems on pig farms is that they frequently involve the association of multiple agents, a phenomenon known as porcine respiratory disease complex (PRDC). Porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are two important viral pathogens which are part of the PRDC (Brockmeier *et al.* 2002, Opriessnig *et al.* 2011).

PCV2 is a member of the *Circoviridae* viral family, genus *Circovirus* (Lefkowitz *et al.* 2018), with a small circular single-stranded DNA genome (Lefkowitz *et al.* 2017). Eight genotypes of PCV2 have been described so far (PCV2a-PCV2h) (Franzo and Segales 2018, Wang *et al.* 2020, Link *et al.* 2021). PCV2 is associated with several syndromes and pathological conditions in pigs, which have been grouped under the term porcine circovirus-associated diseases (PCVAD) (Gillespie *et al.* 2009). The PCVADs include the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), reproductive failure, PRDC, granulomatous enteritis, necrotizing lymphadenitis, and exudative epidermitis (Allan *et al.* 2000, Thomson *et al.* 2000, Pallares *et al.* 2002, Dan *et al.* 2003, Kim *et al.* 2003, Gillespie *et al.* 2009). It is reported that co-infection of PCV2 with other swine pathogens may enhance PCV2 infection and the severity of PCVAD (Dorr *et al.* 2007, Gillespie *et al.* 2009, Yi and Liu 2010, Opriessnig and Halbur 2012, Hu *et al.* 2017).

PRRSV is the etiological agent of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), which is considered as one of the most economical important disease in swine production (Neumann *et al.* 2005). PRRSV is an enveloped, single-stranded positive sense RNA virus classified in the order *Nidovirales*, family *Arteriviridae*. It belongs to the genus *Betaarterivirus* that is divided into the species *Betaarterivirus suid 1* (formerly the European genotype or type I represented by the Lelystad strain) and *Betaarterivirus suid 2* (formerly the North American genotype or type II represented by the ATCC VR-2332 strain) (Lefkowitz *et al.* 2017). Along with respiratory and reproductive problems caused by PRRSV infection in pigs, reduced weight gain and an increase in mortality from secondary infections can also be observed (Solano *et al.* 1997, Thanawongnuwech *et al.* 2000, Yu *et al.* 2012).

PCV2b and PRRSV have a worldwide distribution and co-infection with both viruses is reported as one of the most predominant pathogen combinations being involved in PMWS (Pallares *et al.* 2002, Gagnon *et al.* 2007) with a ratio of co-infection ranging from 20% to 83% (Sorden *et al.* 1998, Allan and Ellis 2000, Segales *et al.* 2002, Wellenberg *et al.* 2004). In fact, PRRSV infection is considered a major risk factor for PMWS in PCV2-infected pigs (Fraile *et al.* 2009). Moreover, several studies suggested that PRRSV may enhance PCV2 infection and the severity of PCVAD (Shi *et al.* 2008, Sinha *et al.* 2011, Opriessnig *et al.* 2012, Fan *et al.* 2013, Park *et al.* 2014).

PCV2 and PRRSV are transmitted through the oronasal route. Alveolar and/or intravascular macrophages are known as the major target cells for both PCV2 and PRRSV in the lungs (Thanawongnuwech *et al.* 2000, Chang *et al.* 2005, Tsai *et al.* 2012). It has been reported that *in vitro* effects of PCV2/PRRSV co-infection in alveolar macrophages include a reduction in PRRSV antigen-containing rate and cytopathic effect, as well as an increase in the levels of *IL8*, *TNF- α* , *IFN- α* , and *FasL* transcripts (Tsai *et al.* 2012). Moreover, Miller *et al.*, 2020, compared the transcriptome response within the tracheobronchial lymph nodes of swine experimentally infected with PCV2, PRRSV or influenza virus. The authors of the mentioned study identified differentially expressed genes (DEGs) and cellular pathways that were modulated by both, PCV2b and PRRSV infections. However, the samples for that study were obtained from single-infected animals and not from co-infected animals (Miller *et al.* 2020).

Respiratory epithelial cells are in the first line of defense against viruses infecting the respiratory tract. They have an important role in the initial recognition of viral pathogens via pattern recognition receptors (PRRs) and subsequent production of cytokines and chemokines to trigger innate and adaptive immune responses (Vareille *et al.* 2011, Günther and Seyfert 2018). Interestingly, PCV2 and/or PRRSV antigens have been observed in epithelial pulmonary cell types such as bronchiolar epithelial cells, sloughed pneumocytes, including some syncytial cells and epithelial cells of the lung parenchyma (Pol *et al.* 1991, Halbur *et al.* 1994, Rossow *et al.* 1996, Sirinarumitr *et al.* 2001). Nevertheless, to our knowledge, no study has been conducted to elucidate the *in vitro* effects of PCV2b/PRRSV co-infection in lung epithelial cells. The hypothesis of the present study is that PCV2b/PRRSV co-infection modify the pathogenesis of both viruses in porcine respiratory epithelial cells compared to PCV2b or PRRSV single-infected cells. In that regard, this research aimed to determine the effects of PCV2b/PRRSV co-infection on viral

replication, cytokines transcriptional expression, cell viability and cellular gene expression using an *in vitro* porcine respiratory tract epithelial cells model. Comparative analysis of differential gene expression after 3' mRNA-sequencing on single-infected and co-infected cells was carried out to identify DEGs that could be involved in the pathogenesis of PCV2b/PRRSV co-infection. Dual specificity phosphatase 1 gene (*DUSP1*) was identified among the DEGs in single-infected and co-infected cells. *DUSP1* has been previously implicated in the infection of several virus including Vaccinia virus (VACV) (Cáceres *et al.* 2013), JC polyomavirus (JCPyV) (Wilczek *et al.* 2021), Hepatitis C virus (HCV) (Choi *et al.* 2015), Human respiratory syncytial virus (RSV) (Robitaille *et al.* 2017), Sendai virus (SeV) (Robitaille *et al.* 2017) and SARS-CoV-2 virus (Goel *et al.* 2021), leading to either enhanced or reduced viral infection. In the present study, RNA interference (RNAi) methodology was used to confirm the role of *DUSP1* in viral replication during PCV2b/PRRSV co-infection.

2. Material and methods

2.1 Cell lines and viruses

The NPTr-CD163 cells, which were previously obtained by Provost *et al.* 2017, were cultured in Minimum Essential Medium (MEM) (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, ON, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Wisent Bioproducts, QC, Canada), 1 mM sodium pyruvate, 10 I.U./mL of penicillin, 10 µg/mL of streptomycin and 250 g/L amphotericin B solution (Wisent Bioproducts, QC, Canada). MARC-145 cells (ATCC CRL-12231) were maintained as previously described (Lévesque *et al.* 2014). All cell lines were cultivated at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. The PCV2b strain (FMV-06-0732) used in this study was isolated from a 2006 Canadian PMWS clinical case (GenBank accession number: JQ994270). The virus was propagated into NPTr-CD163 cells, purified and concentrated following ultracentrifugation on a 30% sucrose cushion using the SW28 Beckman Coulter rotor (Beckman Coulter Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) at 25000 rpm for 4 hours. The PRRSV type II Quebec reference strain IAF-KLOP, previously isolated in Canada (Dea *et al.* 1996), was used in this study. The virus was propagated in MARC-145 cell line as previously described (Provost *et al.* 2012). The PCV2b and PRRSV infectious viral titers were determined in NPTr-CD163 and MARC-145 cells, respectively, by the Spearman-Kärber method (Spearman 1909, Kärber 1931). Immunofluorescence assay (IFA) was used to identify

PCV2b antigens expressing cells whereas cytopathic effect (CPE) was used for PRRSV. The viral titer was expressed in tissue culture infectious dose 50% per mL (TCID₅₀/mL).

2.2 PCV2b and PRRSV co-infection

NPTr-CD163 cells (6×10^6 cells) were infected in suspension with PCV2b (MOI 0.05) and at least three passages were done with the infected cells to achieve a continuous viral infection. Then, PCV2b-infected cells were co-infected with PRRSV at 0.5 MOI for 4 hours and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) 1X. Fresh medium with 2 % FBS was added and the cells were incubated for 24 hours.

2.3 Immunofluorescence assay

An immunofluorescence assay (IFA) was used to confirm if PCV2b and PRRSV dual infection occurred in NPTr-CD163 cells. Briefly, 1×10^4 PCV2b/PRRSV co-infected cells were fixed with a mixture of acetone-methanol (50/50, v/v) and incubated for 20 minutes at room temperature. Then, cells were washed three times with PBS 1X and were permeabilized with a solution containing 0.1% triton X-100 in PBS for 10 min. Following incubation with a blocking solution (1% bovine serum in PBS-Tween 20 for 20 min) the cells were incubated with a 1/200 dilution of a polyclonal PCV2 porcine antiserum and a 1/200 dilution of $\alpha 7$ rabbit monospecific antisera, a specific anti-N PRRSV antibody (Gagnon *et al.* 2003). After three PBS 1X washes, cells were incubated with a 1/75 dilution of a goat anti-swine rhodamine conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) and a 1/200 dilution of goat anti-rabbit FITC conjugated (Invitrogen, CA, USA). After three washing steps, the cells were visualized using a DMI 4000B reverse fluorescence microscope. Photographs of the cells were taken with a DFC 490 digital camera and the images were analyzed using the Leica Application Suite Software, version 2.4.0 (Leica Microsystems Inc., Richmond Hill, Canada).

2.4 PCV2b and PRRSV genome copy number quantification

To quantify PCV2b in the infected cells, the latter were subjected to 2-3 rounds of freeze-thaw cycles to release the virus particles and the cell debris was removed by centrifugation at 8000 rpm at 4°C for 15 min. Afterwards, 50 μ L of sample were diluted in 150 μ L of sterile PBS and treated with 20 μ L of proteinase K (Qiagen™, Mississauga, ON, Canada) at 70°C for 5 minutes. The DNA was purified with Qiagen's QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen™, Mississauga, ON, Canada)

according to the manufacturer instructions. Two microliters of purified DNA were used for qPCR reactions with Taq Man Fast Advanced Master Mix and a QuantStudio3 Real Time PCR System (Thermo Scientific). The primers and probes used for PCV2b quantification are shown in supplemental table S1 (Alvarez 2014, Hernandez Reyes *et al.* 2018). PCV2b genome copy number was determined by comparing sample results to a standard curve generated with ten-fold serially dilutions of PCV2b genomic DNA of known concentration. To establish the standard curve, the viral genome was extracted with Qiagen's QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen™, Mississauga, ON, Canada) from the purified viral stock. The DNA concentration was measured using a Qubit Fluorometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). The nanograms of purified genomic DNA was converted to copy number using a free-access copy number calculator (sciprim.com/html/copyNumb.v2.0.html).

For PRRSV quantification, total RNA was extracted from infected cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and quantified as described above. The purified RNA (1 µg) was used in real-time RT-PCR reactions using the TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher) and a QuantStudio3 Real Time PCR apparatus (Thermo Fisher Scientific). The instrument's software determined the normalized quantity of PRRSV in the samples using standard curves for PRRSV and the endogenous controls (β_2 -microglobulin (*B2M*), β -actin (*ACTB*) and peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*)). To generate standard curves of the endogenous control genes, total RNA was extracted and quantified from mock-infected cells as described above and ten-fold serial dilutions were done. The software generated the standard curves for each endogenous control gene from the same RNA preparations using the corresponding primers and probes (supplemental table S1). To generate the standard curve used to interpolate PRRSV genome copy number in the samples, PRRSV genome was purified using RNeasy Mini Kit (Qiagen) from highly purified viral stock. Thereafter, it was quantified using a Qubit Fluorometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). and converted to copy number using the free-access copy number calculator described above. Finally, ten-fold serial dilutions were done as described above. The primers and probes used for PRRSV quantification are shown in supplemental table S1.

2.5 Viral replication kinetics

1 x 10⁵ NPTr-CD163 cells were infected with PCV2b and/or PRRSV as described above. Cells were collected at 4, 24, 48, 72 and 96 hours PRRSV post-infection and each virus was quantified by qPCR as described above. All viral infections were performed two times in triplicate.

2.6 Cell viability assay

Cell viability assay was performed on 10⁴ mock-infected, single-infected and co-infected cells at 72 hours post-infection (hpi) using the Cell titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's instructions. After adding 20 µL of the reagent to each well, the cells were incubated for 2 hours at 37 °C and the absorbance was measured at 490 nm (Biotek® Synergy HT plate reader, Vermont, USA). The percentage of cell viability was calculated using the mock-infected cells as control. Each experiment was performed in triplicate and repeated at least two times.

2.7 Cytokine mRNAs' expression

The mRNA expression levels of *IL6*, *IL8*, *IL10*, *IFN-α*, *IFN-β* and *IFN-γ* in PCV2b/PRRSV single-infected and co-infected cells were measured by RT-qPCR. For that purpose, 6 x 10⁶ infected and mock-infected cells were incubated in 6 well plates for 72 hours. Total cellular RNA was extracted and purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration was measured with a Qubit fluorometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and 1µg of purified RNA was reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, CA), following the manufacturer's protocol. The cDNA was then amplified with PowerTrack SYBR Green Master Mix kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) with a QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). The 2^{-ΔΔCt} method was used to quantify the differences between groups. Normalized genes *B2M*, *ACTB* and *PPIA* were used to compensate for potential differences in cDNA amounts. Mock-infected cells were used as a calibrator reference in the analysis. The primers used in this assay are described in supplemental table S1.

2.8 3' RNA-seq Transcriptome Library Preparation and Sequencing

Total cellular RNA was purified from 1×10^6 single infected, co-infected or mock-infected cells at 72 hpi using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Before library construction, RNA concentration and quality were assessed with Agilent 2100 Bioanalyzer using RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, CA, USA). Only extracted/purified RNAs with an RNA integrity number (RIN) of at least 7 were used for the mRNA libraries synthesis. A total of 0.5 ng of purified RNA was used for the mRNA library constructions with the QIAseq UPX 3' Transcriptome Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada), according to the manufacturer's protocol. Briefly, using this kit, each RNA molecule in the samples is tagged with a Unique Molecular Index (UMI) and an unique sample ID during reverse transcription, so all individually tagged cDNAs from all samples can be combined, which enables all subsequent library construction steps to be performed in a single tube (<https://www.qiagen.com>). After reverse transcription reactions, the synthesized cDNAs from PCV2b-, PRRSV-, PCV2b/PRRSV- and mock-infected cells were combined in a single tube to obtain the sequencing libraries according to the QIAseq UPX 3' Transcriptome Kit (Qiagen) protocol. Libraries concentrations were measured with a Qubit Fluorometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and their quality were assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer instrument with the Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies, CA, USA). High throughput sequencing was carried out using the MiSeq sequencing platform (Illumina, CA, USA). The libraries were sequenced using v3 (150-cycles) MiSeq Reagent Kits from Illumina.

2.9 Identification of differentially expressed genes

The sequencing raw data were imported in FASTQ format into CLC Genomics Workbench software (QIAGEN, version 22.0.1, Qiagen, CA, USA). The reads were demultiplexed using the UPX 3' RNA application, quantified with the Quantify QIAseq UPX 3' ready-to-use workflow and the generated gene expression annotations obtained after mapping to the reference genome (Scrofa11.1) were used in subsequent data analyses. The differential expression analysis was performed with the Differential Expression for RNA-Seq tool available in CLC Genomics Workbench software, version 20.0. Here, a per-sample library size normalization is automatically performed using the TMM (trimmed mean of M values) normalization method (Oshlack *et al.* 2010, Robinson and Oshlack 2010) in order to compensate for differences in the sequencing depth between samples. The gene

expression levels of PCV2b-, PRRSV- and PCV2b/PRRSV- infected cells were compared to the one found in mock-infected control cells. A False Discovery Rate (FDR) <0.05 and a fold-change cutoff of 1.5 was used to identify significant differentially expressed genes (DEGs). Physical interactions between the identified DEGs in each type of infection were determined with Metascape(Zhou *et al.* 2019).

2.10 GO and KEGG Enrichment Analysis

Gene Ontology (biological process) enrichment analysis was performed with PANTHER (Ashburner *et al.* 2000, The-Gene-Ontology-Consortium 2021). An FDR < 0.05 was used to filter the over-represented or enriched terms from the analyzed DEG sets. In order to remove redundant gene ontology (GO) terms, the terms presenting a Fold Enrichment > 2 were imported into REVIGO (Supek *et al.* 2011). The terms having dispensability values score < 0.4 were retained. An enrichment analysis of the KEGG cell pathways was performed using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID 2021) (Huang *et al.* 2009). Significant enriched pathways in the analyzed DEG sets were filtered using an FDR cut-off < 0.05 and Fold Enrichment > 2.

2.11 *DUSP1* gene knockdown in PCV2b/PRRSV co-infected cells

Prior to *DUSP1* knockdown experiment, *DUSP1* mRNA fold regulation was determined in PCV2b and PRRSV single-infected and co-infected cells at 24, 48, 72 and 96 hpi. *DUSP1* mRNA expression levels were measured by RT-qPCR using *DUSP1* specific primers (supplemental table S1) and the same protocol described above for cytokine mRNA expression analysis. Thereafter, the *DUSP1* expression was reduced using the dicer-substrate short interfering RNAs (DsiRNAs) molecules. Four DsiRNAs targeting porcine *DUSP1* were generated using the DsiRNA design tool from Integrated DNA Technologies (Integrated DNA Technologies, IDT, CA USA). DsiRNAs are chemically synthesized 25/27-mer duplex RNAs that have increased potency compared to 21mer siRNAs (Integrated DNA Technologies, IDT, CA USA). *DUSP1* specific DsiRNAs and scrambled DsiRNA negative control (Integrated DNA Technologies, IDT, CA USA) were resuspended in RNase-free Duplex Buffer (Integrated DNA Technologies, IDT, CA USA) according to IDT Technologies guidelines. The performance of all four designed DsiRNAs was initially evaluated in mock-infected cells. To accomplish this objective, reduced expression of *DUSP1* mRNA and cell viability were

determined in DsiRNAs transfected mock cells. DsiRNA # 10 and DsiRNA # 12 were selected for further transfection experiments in co-infected cells. The sequences of DsiRNA #10 and #12 are shown in supplemental table S1.

Reverse transfection experiments were performed using Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen by Life Technologies) diluted in Opti-MEM Medium, according to the manufacturer's instructions. DsiRNA #10 and DsiRNA #12 were pooled and diluted in Opti-MEM Medium. Then, DsiRNA-RNAiMAX complexes were prepared in a 24-well plate (1:1 ratio) with DsiRNAs at a final concentration of 10 nM. PCV2b-previously infected cells (1×10^5 cells) were added to DsiRNA-RNAiMAX complexes in each well, allowing the cells to grow for 24 hours before PRRSV infection. Following PRRSV infection, transfected and co-infected cells were incubated for 3 days at 37°C and then, viral replication was determined and cells were processed to quantify *DUSP1* mRNA and protein expressions. Reverse transfection experiments using scrambled DsiRNA negative control (Integrated DNA Technologies, IDT, CA USA) were performed in parallel as described above. A minimum of three biological replicates were done.

2.12 Western blot assays

Cells were disrupted in Laemmli buffer (62.5 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 10 % glycerol and 100 mM DTT) 72 hours after cell infections or transfection assay. Briefly, the cells were washed in the plate three times with ice-cold PBS 1X. After adding cold Laemmli sample buffer, the cells were scraped, collected and the samples were boiled at 100° C for 5 minutes. Following a centrifugation step at 14 000 rpm for 5 minutes at 4° C, the supernatant was collected and stored at -80°C until further use. Total cell protein concentrations were measured using a Qubit Fluorometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions. Using a Tetra cell apparatus (Bio-rad), 20 µg of total proteins were resolved in 12% SDS-PAGE. Proteins were then transferred into a LF-PVDF membranes using a tank blotting system (TransBlot; BioRad, Mississauga, ON, Canada) and membranes were subsequently cut to horizontal strips corresponding to the expected kilodaltons (kDa) molecular weight of targeted proteins. The membranes were blocked in TTBS (tris-buffered saline with 0.1% Tween 20) containing 5% (w/v) BSA and incubated with anti-DUSP1 (1/2000 in TTBS, Biorbyt, orb317657, Invitrogen). Anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated (Cell Signaling Technology, USA) diluted 1/20,000 in TTBS containing 5% (w/v) BSA was used as the secondary antibody. Each incubation step was followed by three washes of 5 minutes each in

TTBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.1% (v/v) Tween-20, pH 7.5). The protein bands were visualized using ECL detection kits (Bio-rad). The same membranes were mild striped and were re-probed with anti- β -actin (1/10,000 in TTBS; sc-47778 HRP Santa Cruz) to confirm equal protein loading into the electrophoretic polyacrylamide gel. Densitometric analyses were performed with ImageJ software after background subtraction. For each protein, intensities were calibrated to a calibrator sample, and the calibrated intensity was normalized compared to β -actin control.

2.13 Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Prism 7.0.0). The different statistical tests being used within each analysis are described in figure legends. Data are presented as means \pm standard deviation (SD) from at least three independent experiments. Experimental groups were considered significantly different when p -value < 0.05 .

3. Results

3.1 NPTr-CD163 cells, a new model for PCV2b/PRRSV co-infection studies

NPTr-CD163 cells were infected with PCV2b virus for 2-3 passages to obtain persistently infected cells and then were co-infected with PRRSV for 96 hours. This approach allowed to study the cells co-infected with PCV2b and PRRSV even when both viruses have different replication kinetics. Moreover, this strategy resembles the dynamics of viral mixed infections in the field where subclinical PCV2b infections are widespread and animals may be infected with PCV2b before being infected with PRRSV. IFA results showed that NPTr-CD163 cells could support a stable PCV2b infection. Interestingly, with IFA it was evidenced that both PCV2b and PRRSV viruses can co-localize simultaneously in the same NPTr-CD163 infected cells (Figure 1D).

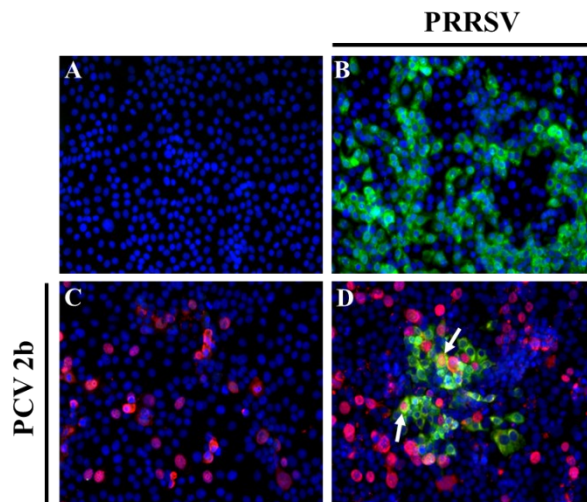


Figure 1. PCV2b and PRRSV can infect and co-localized in NPTr-CD163 cells. IFA was performed on PCV2b (red) and PRRSV (green) co-infected cells at 72 hpi. The cells were infected with 0.05 MOI of PCV2b and passaged at least three times. Then, PCV2b-infected cells were infected with 0,5 MOI of PRRSV. Nuclear staining with DAPI is shown in blue. Co-localization pictures were done with ImageJ. Mock-, PRRSV-, PCV2b- and PCV2b/PRRSV infected cells are shown in Figures 1A, 1B, 1C and 1D, respectively. The white arrows points to single cells showing both PCV2b and PRRSV antigens.

However, during PCV2b/PRRSV co-infection, most of the cells were infected only by one of the virus (Figure 1D). Sirinarumitr *et al.* (2001) reported similar results using double *in situ* hybridization of pigs lungs infected by both PCV/PRRSV viruses (Sirinarumitr *et al.* 2001). Thus, our model recapitulates key observations that PCV2 and PRRSV can co-localize in swine respiratory cells.

3.2 PCV2b and PRRSV dual infection modulates viral replication kinetics in NPTr-CD163 cells

To study the effect of PCV2b and PRRSV dual infection on viral replication, the replication efficiency of each virus was determined in the co-infection model compared to single-infected cells. PCV2b replication was found to significantly increase starting at 48 hpi in co-infected cells compared to PCV2b single-infected cells (Figure 2A), whereas PRRSV replication was significantly decreased at 72 hpi and 96 hpi in co-infected cells compared to PRRSV single-infected cells (Figure

2B). These results highlight that the replication machinery of this respiratory cell line may be hijacked by the co-infection.

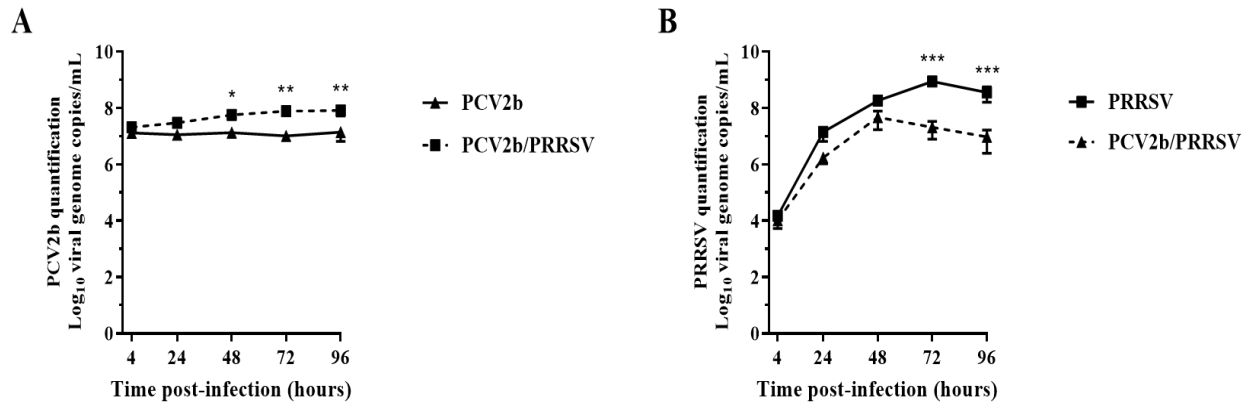


Figure 2. PCV2b/PRRSV co-infection modulates viral replication in NPTr-CD163

cells. The PCV2b (A) and the PRRSV (B) genome copy number was measured in single infected and co-infected cells by qPCR and RT-qPCR, respectively. Statistical analyses were done using a two-way repeated measures ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test to compare the quantity of viral genome between single infected and co-infected cells at different time points. A Tukey's multiple comparisons test was performed to determine the statistically significant differences between time points in a same infection. Data are presented with standard deviation (SD) of three biological replicates. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

3.3 PCV2b/PRRSV co-infection decreases cell viability in regards to PRRSV-single-infected cells

To determine the effect of PCV2b/PRRSV co-infection on cell viability, single-infected and co-infected cells were evaluated at 72 hpi. PRRSV infection alone did not affect NPTr-CD163 cell viability whereas PCV2b alone and in co-infection reduced the cell viability compared to the mock-infected cells (Figure 3).

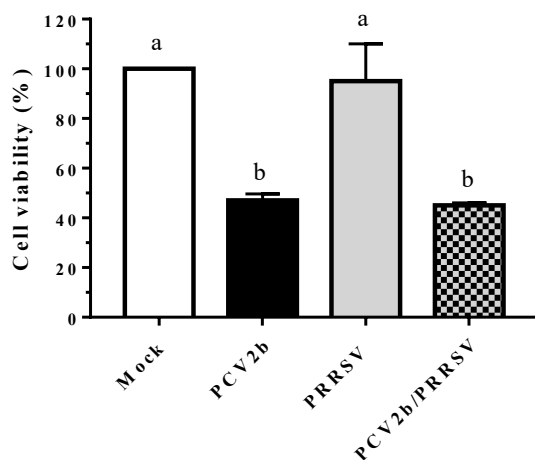


Figure 3. PCV2b and PRRSV decrease cell viability on co-infected and PCV2b single-infected cells. Cell viability was determined at 72 hpi on mock-infected, single-infected or co-infected PCV2b/PRRSV cells. The data represents the percentage of cell viability in infected cells with respect to mock-infected cells and are presented with standard deviation (SD) of three biological replicates. Statistical analyses were done using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Bars labelled with different superscripts letters within the same assay indicates that these sets of data are statistically different ($p < 0.05$).

However, no difference was observed between co-infected and PCV2b single-infected cells suggesting that the effect on cell viability decrease is mostly driven by PCV2b. Collectively, these results reveal that PCV2b, but not PRRSV, could promote respiratory cell injury contributing to the pathogenesis of the co-infection *in vitro*.

3.4 Cytokines mRNA expression modulation in PCV2b/PRRSV co-infected cells

It is well known that PCV2b and PRRSV infections can alter the host immune response by modulating the expression of interleukins and interferons (Kekarainen *et al.* 2010, Sang *et al.* 2011). In the present study, *IL6*, *IL8*, *IL10*, *IFN- α* , *IFN- β* and *IFN- γ* mRNA expressions were up-regulated in PCV2b- and PCV2b/PRRSV- infected cells compared to mock-infected cells (fold change > 2) (Figure 4A and 4B), while PRRSV significantly increased the transcriptional expression of *IL8*, *IL10* and *IFN- γ* in infected cells (Figure 4A).

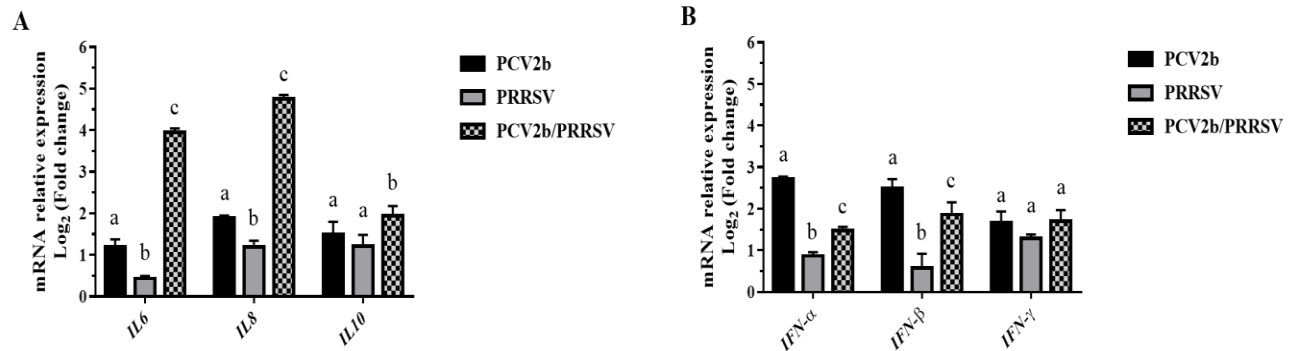


Figure 4. PCV2b and PRRSV co-infection modulates cytokines mRNA expression in NPTTr-CD163 cells. The mRNA expression of *IL6*, *IL8* and *IL10* (A) and *IFN-α*, *IFN-β* and *IFN-γ* (B) was determined by qRT-PCR assays. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to calculate the fold change of cytokines mRNA expression in infected cells with respect to mock-infected cells at 72 hpi. An ordinary two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was performed to determine the statistical differences between single-infected and co-infected cells. All data are presented with standard deviation (SD) of three biological replicates. Bars labelled with different superscripts letters within the same assay indicates that these sets of data are statistically different ($p < 0.05$).

In co-infected cells, interleukins mRNA expressions were significantly higher than in single-infected cells (Figure 4A). Interestingly, *IFN-α/β* expression was significantly lower in co-infected cells than in cells infected only with PCV2b (Figure 4B). Nevertheless, the *IFN-α/β* mRNA expression remained significantly higher in co-infected cells than in PRRSV single-infected cells and mock-infected cells. This could explain the reduction in PRRSV replication observed in dually infected NPTTr-CD163 cells in the present study, considering that type I interferons inhibit PRRSV replication (Brockmeier *et al.* 2017, Zhu *et al.* 2021). Collectively, these results confirm that co-infection with both PCV2b and PRRSV differentially modulates cytokine transcriptional response in NPTTr-CD163 cells compared to single-infected cells.

3.5 Identification of differentially expressed genes and enrichment analysis

To better characterise the transcriptional landscape conferred by the co-infection, the cellular gene expression profile was analyzed in single-infected and co-infected cells. Differential gene expression analysis identified 127, 32 and 84 DEGs in PCV2b-, PRRSV- and PCV2b/PRRSV- infected cells, respectively, compared to mock-infected cells (Figure 5A). The DEGs in each infection and the level of modulation are shown in supplemental tables S2 and S3. GO enrichment analysis

performed with the corresponding lists of DEGs showed an over-representation of cellular processes mainly related to cytoplasmic translation, metabolic processes, biosynthetic processes and gene expression in PCV2b single-infected and in co-infected cells (Figure 5B).

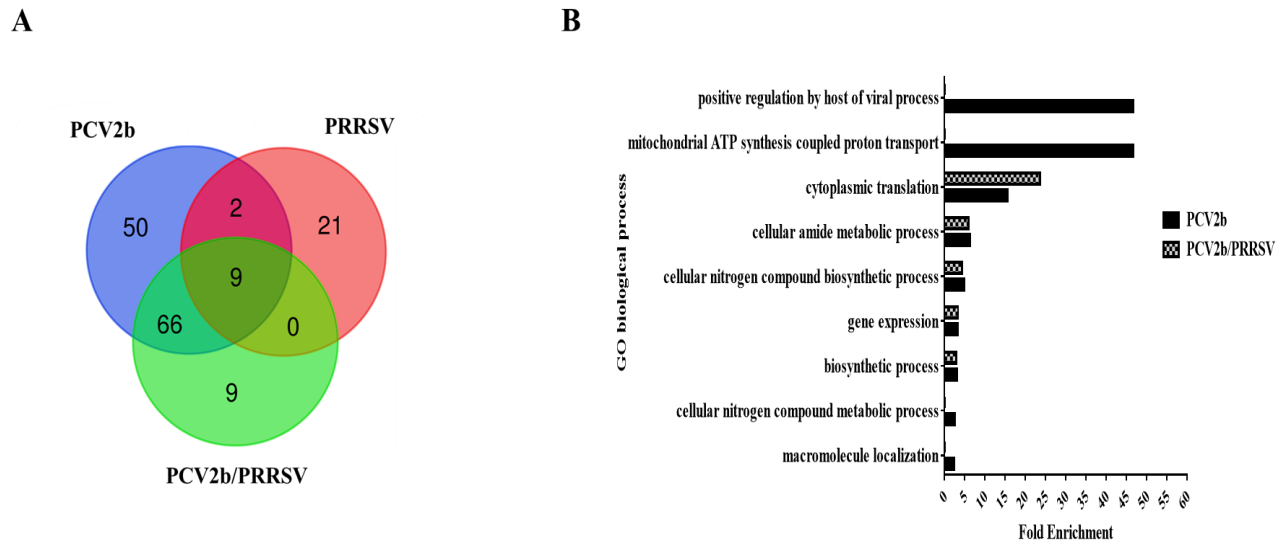


Figure 5. PCV2b and PRRSV modulates gene expression and biological process in single-infected and co-infected cells. The Venn diagram (A) shows the amount of differentially expressed genes (DEGs) in single-infected and co-infected cells. Mock-infected NPTr-CD163 cells were used as a control to identify the DEGs in infected cells. The numbers in overlapping areas represent the amount of DEGs shared by both experimental groups. A False Discovery Rate (FDR) < 0.05 and a 1.5-fold-change cutoff were used to identify the DEGs. GO enrichment analysis was performed with the DEGs identified in PCV2b infected and PCV2b/PRRSV co-infected cells (B). Enriched GO terms (biological process) with FDR value < 0.05 and fold enrichment > 2 are illustrated.

Moreover, in PCV2b infected cells, a protein-protein interaction enrichment analysis revealed that several DEGs formed a cluster of ribosomal proteins involved in SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane, nonsense mediated decay (NMD) enhanced by the exon junction complex (EJC), membrane trafficking, vesicle-mediated transport, protein stabilization and negative regulation of translation and biosynthetic process (supplemental figure S1). However, the low number of DEGs identified in PRRSV single-infected cells did not allow to detect significantly enriched biological processes or relevant proteins clusters associated to cellular pathways in PRRSV-infected cells. Nonetheless, these results highlight the differential

modulation of cellular genes in single-infected and co-infected cells, which could have a potential role in viral replication.

3.6 PCV2b and PRRSV co-infection upregulates *DUSP1* mRNA and protein expression

In the present study, PCV2b replication was enhanced after PRRSV co-infection in NPTr-CD163 cells. After the identification of DEGs in the infected cells, functional studies were performed to evaluate the role of a selected DEG in the pathogenesis of PCV2b/PRRSV co-infection. To identify the best candidates for gene functional studies, the list of DEGs was filtered by setting an FDR < 0.001. Among the 19 DEGs having an FDR < 0.001, *DUSP1* was identified among the most up-regulated genes in co-infected cells (supplemental table S2). Therefore, *DUSP1* was selected for further studies based also on previous reports showing the involvement of this gene in the replication of several viruses (Cáceres *et al.* 2013, Choi *et al.* 2015, Robitaille *et al.* 2017, Goel *et al.* 2021, Wilczek *et al.* 2021). *DUSP1* mRNA and protein expression was determined by RT-qPCR at different time post-infection and by Western blot at 72 hpi, respectively.

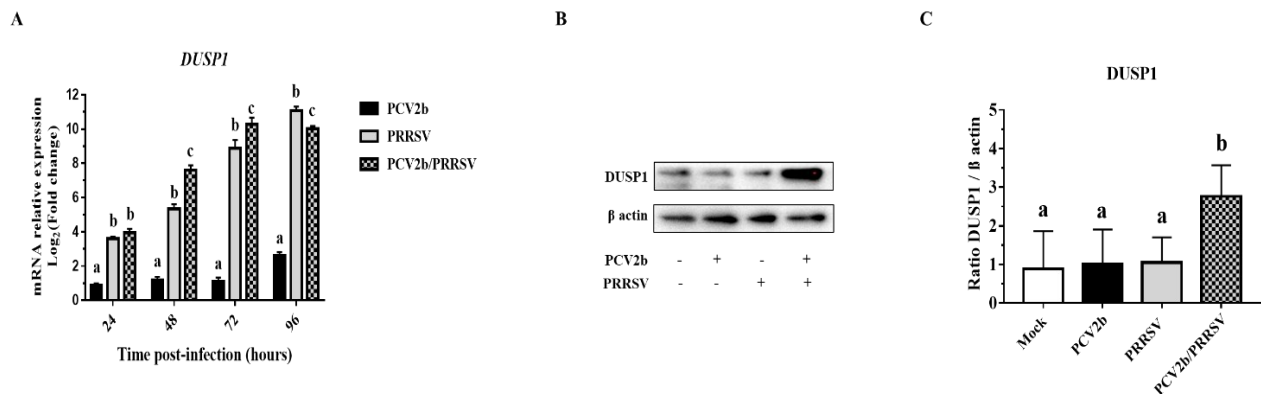


Figure 6. *DUSP1* expression was differentially modulated in PCV2b and PRRSV single-infected and co-infected NPTr-CD163 cells. *DUSP1* mRNA expression (A) was measure by RT-qPCR at different times post-infection. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to calculate the fold change of mRNA expression in infected cells with respect to mock-infected cells. *DUSP1* protein was quantified by Western blot at 72 hpi (B and C). Statistical analyses were done using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. All data are presented with standard deviation (SD) of at least 3 biological replicates. Bars labelled with different superscripts letters within the same assay indicates that these sets of data are statistically different ($p < 0.05$).

As shown in Figure 6, *DUSP1* mRNA expression was significantly upregulated at all time points post-infection (from 24 to 96 hpi) in co-infected and PRRSV-infected cells compared to mock-infected cells. Moreover, the *DUSP1* mRNA expression was also significantly higher in PCV2b/PRRSV co-infected cells compared to PRRSV infected cells at 48 and 72 hpi. In PCV2b infected cells, *DUSP1* mRNA expression was significantly upregulated at 96 hpi, compared to mock-infected cells. Overall, *DUSP1* mRNA expression in PCV2b infected cells was significantly much weaker compared to PRRSV and PCV2b/PRRSV-infected cells. Moreover, *DUSP1* protein expression was also significantly increased in co- infected cells compared to single-infected cells at 72 hpi (Figure 6B and 6C). This study provided evidence that an infection with PCV2b and PRRSV induce upregulation of the expression of *DUSP1* in respiratory epithelial cells (NPTr-CD163 cells), prompting us to decipher how it influenced viral replication during co-infection.

3.7 Transient knockdown of *DUSP1* reduces PCV2b replication while it enhances PRRSV replication in PCV2b/PRRSV-infected cells

To determine the effect of *DUSP1* on PCV2b replication in PCV2b/PRRSV-infected cells, DsiRNAs targeting swine *DUSP1* were used to decrease its mRNA expression. *DUSP1* specific DsiRNAs efficiently reduced the gene and protein expression in PCV2b/PRRSV-infected cells (Figure 7) without having an impact on cell viability (supplemental figure S2).

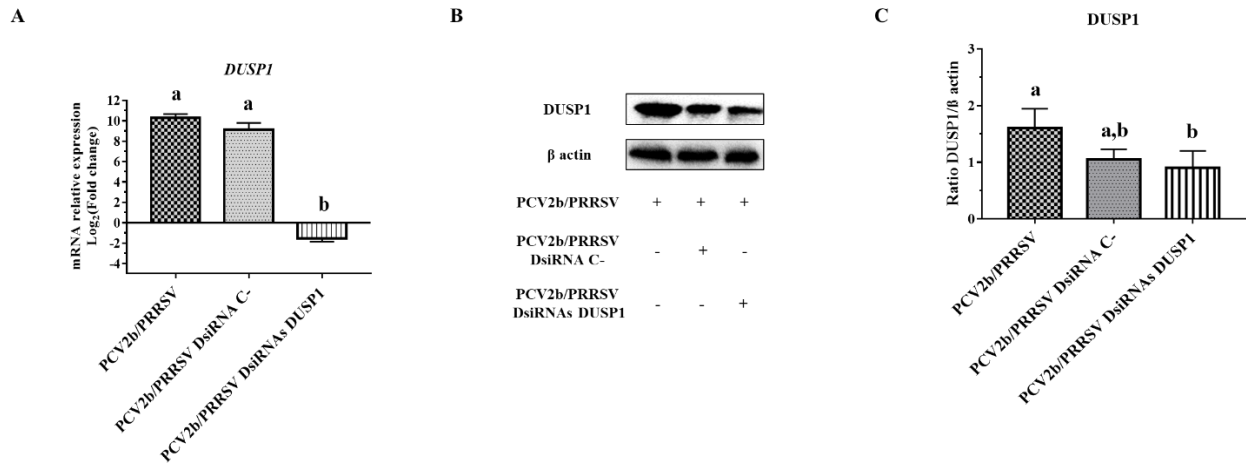


Figure 7. DsiRNAs targeting swine *DUSP1* decrease gene and protein expression in PCV2b/PRRSV co-infected NPTr-CD163 cells. *DUSP1* mRNA expression (A) was measured by RT-qPCR. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to calculate the fold change of mRNA expression in infected and/or transfected cells with respect to mock-infected cells. Knockdown of *DUSP1* protein was confirmed by Western blot at 72 hpi (B and C). Statistical differences between two groups of samples were determined by paired t-test. All data are presented with standard deviation (SD) of at least 3 biological replicates. Bars labelled with different superscripts letters within the same assay indicates that these sets of data are statistically different ($p < 0.05$).

PCV2b genome copies were significantly reduced in co-infected cells transfected with *DUSP1* DsiRNAs when compared to co-infected cells transfected with scrambled DsiRNA or not transfected (Figure 8), confirming that *DUSP1* knockdown decreased PCV2b replication in co-infected cells.

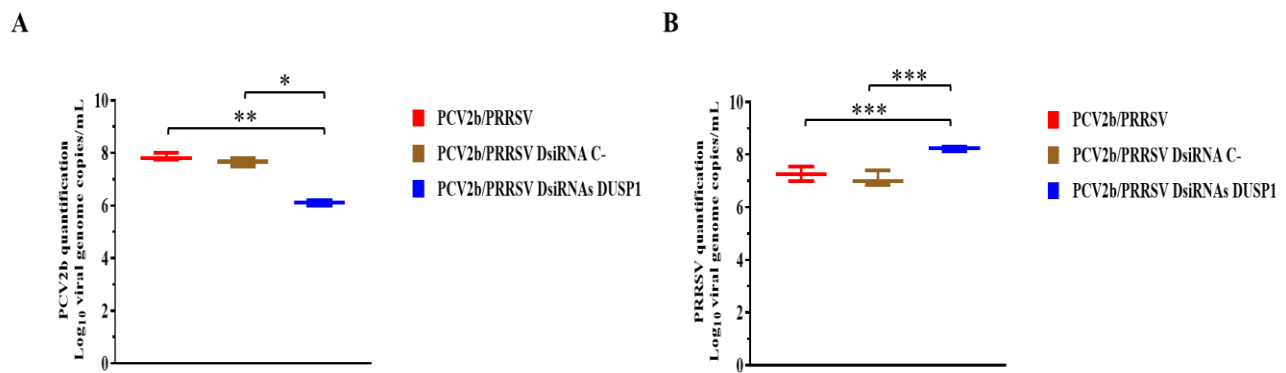


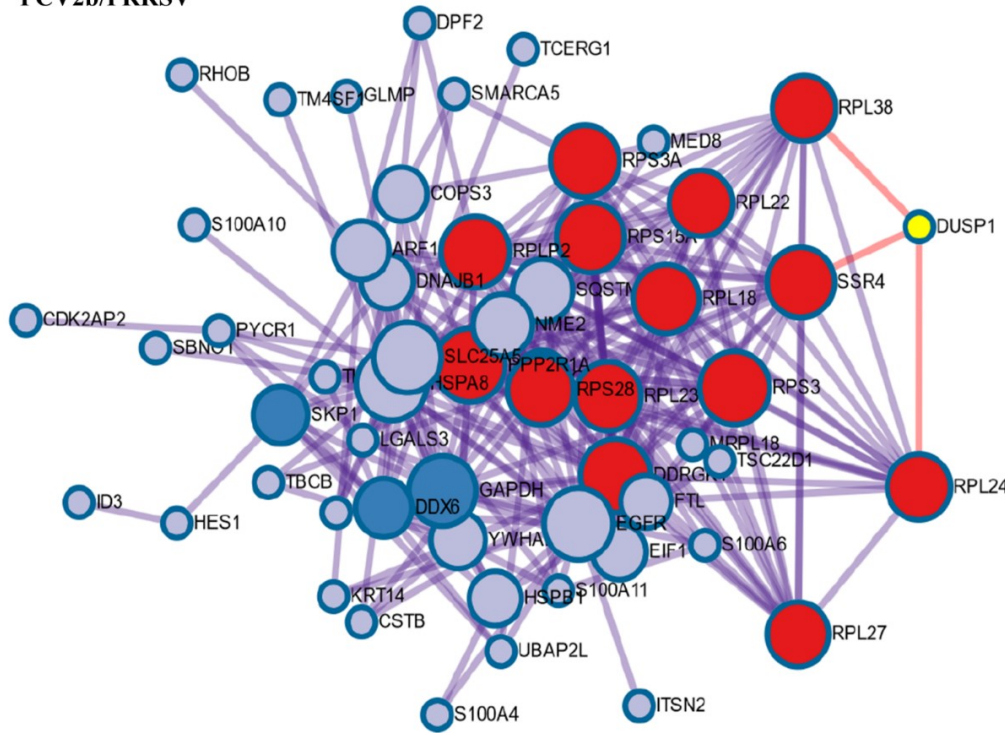
Figure 8. Transiently knockdown of *DUSP1* influenced viral replication in PCV2b/PRRSV-infected NPTr-CD163 cells. The PCV2b (A) and the PRRSV (B) genome copy number was measured by qPCR and RT-qPCR, respectively, in co-infected cells after transfection with DsiRNA targeted *DUSP1* or scrambled DsiRNAs. For statistical analysis a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was performed. Data are presented with standard deviation (SD) of 3 biological replicates. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

On the other hand, the knock-down of *DUSP1* led to a significant increase in PRRSV replication in co-infected cells compared to co-infected cells transfected with scrambled DsiRNA or not transfected (Figure 8B). While it remains to be understood, this increase in PRRSV genome copies in dually infected cells may have resulted from the reduction in PCV2b genome replication. These results suggest that PCV2b/PRRSV co-infection modulates *DUSP1* expression in infected cells, which in turn, promotes PCV2b replication and negatively impacts the replication of PRRSV in dually infected cells.

3.8 Protein network analysis revealed interaction of *DUSP1* with the protein translocation machinery of the endoplasmic reticulum

To analyze the protein-protein interactions involving *DUSP1* in single-infected and co-infected cells, physical protein-protein interactions (PPIs) between the corresponding proteins of the identified DEGs in each infection were explored using Metascape (<http://metascape.org>) (Zhou *et al.* 2019). The protein-protein interaction enrichment analysis identified that *DUSP1* physically interacts with ribosomal proteins RPL24 and RPL38 as well as with SSR4 (TRAP δ) (Figure 9).

PCV2b/PRRSV



Color	MCODE	GO	Description	Log10(P)
Red	MCODE 1	R-HSA-1799339	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	-27.4
Red	MCODE 1	R-HSA-975957	Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	-27.3
Red	MCODE 1	R-HSA-927802	Nonsense-Mediated Decay (NMD)	-27.3

Figure 9. Protein network analysis with the DEGs identified in PCV2b/PRRSV co-infected cells. Predicted physical protein-protein interactions (PPI) between the corresponding proteins of the identified DEGs in PCV2b/PRRSV co-infected cells is shown. DUSP1 protein is highlighted in yellow. Molecular Complex Detection (MCODE) algorithm was applied to identify densely connected network components. MCODE network is assigned a unique color. Pathway and process enrichment analysis has been applied to the MCODE component. The table shows the best-scoring terms by *p*-value retained as the functional description of the corresponding MCODE component.

These proteins belong to a cluster involved in SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane (R-HSA-1799339) (Figure 9 and supplemental figure S1). This cellular pathway couples the synthesis of nascent proteins to its delivery into the endoplasmic reticulum (ER), therefore minimizing the aggregation or misfolding of nascent proteins before they arrive at their cellular destination (Costa *et al.* 2018). Some studies suggest that the co-translational protein translocation pathway is coupled with the Unfolded Protein Response (UPR) to maintain protein homeostasis in the ER during stress conditions (Plumb *et al.* 2015, Acosta-Alvear *et al.* 2018).

While it remains to be understood, these observations suggest that DUSP1 interactions with components of the ER protein targeting machinery (RPL38 and SSR4 (TRAP δ)) might have a role in ER stress and the UPR. Further studies are required to elucidate the relevance of this interaction on PCV2b infection in co-infected cells, considering that PCV2b replication can be significantly modulated by ER stress and UPR (Niu *et al.* 2022).

4. Discussion

PCV2 and/or PRRSV antigens have been found in respiratory epithelial cells of swine co-infected with both viruses (Pol *et al.* 1991, Halbur *et al.* 1994, Rossow *et al.* 1996, Sirinarumitr *et al.* 2001). Nevertheless, studies concerning the *in vitro* effects of this dual infection in this cell type are scarce, probably due to the lack of a swine respiratory epithelial cell model that allows the simultaneous replication of both viruses. In the present study, *in vitro* effects of PCV2b/PRRSV co-infection were analyzed in the NPTr-CD163 cell line, a swine respiratory epithelial cell line expressing CD163, the main receptor of PRRSV. This cell line is susceptible to infection by both, PCV2b and PRRSV. It was shown that PCV2b and PRRSV dual infection enhanced PCV2b replication in NPTr-CD163 cells whereas that one of PRRSV was decreased in co-infected cells regarding single-infected cells (Figure 2). Those results confirm previous studies showing that PCV2b/PRRSV co-infection influences viral replication (Rovira *et al.* 2002, Sinha *et al.* 2011, Tsai *et al.* 2012). Specifically, Sinha *et al.* (2011) and Rovira *et al.* (2002) reported an increase in PCV2b viremia and replication in PCV2b/PRRSV co-infected pigs compared to pigs infected only with PCV2b (Rovira *et al.* 2002, Sinha *et al.* 2011). However, some studies suggested that PRRSV replication may be favored or not impacted at all in co-infected pigs (Allan *et al.* 2000, Rovira *et al.* 2002, Opriessnig *et al.* 2008). It is noteworthy to mention that Tsai *et al.* (2012) demonstrated that PCV2b antigen expression was stable through time in PCV2b single-infected or co-infected porcine alveolar macrophages (PAM) whereas PRRSV antigens expression was decreased in co-infected cells (Tsai *et al.* 2012). Overall, the different effects of PCV2 and PRRSV dual infection on viral replication reflect the complexity of interactions between PCV2 and PRRSV at the cellular level.

Cell viability was also evaluated after viral infection in the current study. Interestingly, NPTr-CD163 cells possess a very good resilience against PRRSV while none to very low cytopathic effect was observed when they were infected with PRRSV whereas other cells lines such as MARC-145, SJPL (St-Jude Porcine Lung) and PAM cells have been demonstrated to be very sensitive to PRRSV

infection (Levesque *et al.* 2014, Hernandez Reyes *et al.* 2018). However, cell viability was decreased in co-infected cells compared to PRRSV single-infected cells. This was not a result of a synergistic effect of both viruses, since no difference was found on the percentage of cell viability between co-infected and PCV2b single-infected cells. This observation reflects instead the impact of PCV2b infection on the metabolism and functions of NPTr-CD163 cells. It is known that PCV2 impairs the cell survival of NPTr cells (Savard *et al.* 2015) as well as of other epithelial cell types like PK15 cells (Walia *et al.* 2014). Therefore, these results confirm previous finding concerning the impact of PCV2b infection on cell viability.

Cytokines mRNA expressions were modulated by PCV2b and PRRSV infections in our cell model. Previous studies have reported an up-regulation of *IL6*, *IL8*, and *IL10* after PCV2b infection in PK-15 cells, endothelial cells and PAM, respectively (Du *et al.* 2016, Liu *et al.* 2019, Gu *et al.* 2021). Moreover, up-regulation of *IL6*, *IL8*, *IL10* and *IFN- γ* has been previously reported after PRRSV infection *in vivo* and in PAM (Meier *et al.* 2003, Suradhat *et al.* 2003, Wesley *et al.* 2006, Song *et al.* 2013, Liu *et al.* 2017, Xu *et al.* 2021). In the present study, no modulation was observed for *IL6* after PRRSV infection. Díaz *et al.* (2012) also observed no modulation of *IL6* using ELISA test in pigs experimentally infected with PRRSV (Diaz *et al.* 2012). Overall, our results in single-infected NPTr-CD163 cells recapitulates the findings of previous reports. Differential modulation of cytokines responses in PCV2 and PRRSV dually infected macrophages, compared to macrophages infected with PCV2 or PRRSV alone, has been previously reported (Tsai *et al.* 2012). Similar results were obtained in the present study with the NPTr-CD163 cells. The notable increase of *IL6* and *IL8* mRNA expressions observed in co-infected cells suggests that PCV2b and PRRSV dual infection could favor a pro-inflammatory response, which could have an impact in the severity of the respiratory disease in co-infected animals (Van Reeth *et al.* 2002, Pomorska-Mól *et al.* 2014, Wilkinson *et al.* 2015, Turlewicz-Podbielska *et al.* 2021). It is noteworthy to mention that the results of the present study only refer to a modulation of cytokines expression at mRNA level. Further investigation into the production and release by the cells of these cytokines is required. A reduction of type I Interferon transcriptional expression was observed in co-infected cells compared to PCV2b single-infected cells, probably due to PRRSV infection, which is known to impact type I Interferon responses (Patel *et al.* 2010). Type I IFN expression is an inherent cell antiviral response that drives the transcription of several genes involved in the initiation of innate

and adaptive immune responses leading to viral clearance (Murira and Lamarre 2016, Teijaro 2016). While IFN expression can negatively impact the viral replication, for example during PRRSV infection (Brockmeier *et al.* 2017, Zhu *et al.* 2021), some studies reported that PCV2 replication can be enhanced in PK-15 cells and 3D4/31 cells after induction of type I and type II IFN responses. Moreover, this IFN-dependent-enhancement of PCV2 replication was blocked by IFN- α or IFN - γ neutralizing antibodies (Meerts *et al.* 2005). Contrary to these observations, in the current study PCV2b replication increased in the co-infected NPTr-CD163 cells even when the type I IFN transcriptional expression decreased compared to single-infected PCV2b cells (Figure 4B). These results suggest that other cellular mechanisms could be involved in the modulation of PCV2b infection in co-infected NPTr-CD163 cells.

The 3' RNA-seq analysis allowed the identification of cellular DEGs with a potential role on viral replication in co-infected cells, such as *DUSP1*. It is known that *DUSP1* is involved in the replication of several viruses, like Vaccinia virus (VACV), JC polyomavirus (JCPyV), Hepatitis C virus (HCV), Human respiratory syncytial virus (RSV), Sendai virus (SeV) and SARS-CoV-2 virus (Cáceres *et al.* 2013, Choi *et al.* 2015, Robitaille *et al.* 2017, Goel *et al.* 2021, Wilczek *et al.* 2021). In the present study, *DUSP1* mRNA and protein expression was upregulated in co-infected NPTr-CD163 cells compared to PCV2b single infected cells. Moreover, transient knockdown of *DUSP1* expression significantly reduced PCV2b replication in dually infected cells, suggesting a role for *DUSP1* in the modulation of PCV2b in co-infected cells.

It has been reported that PCV2 can activate anti-apoptotic mechanisms at the early stage of infection to favors viral replication while inducing pro-apoptotic mechanisms in the late stage for release and dissemination of virions (Pan *et al.* 2018). It is known that PCV2 triggers ER stress and the UPR in PK-15 cells and PAM (Ouyang *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2019, Wang *et al.* 2021), which leads to apoptosis and in turn facilitates viral replication (Niu *et al.* 2022). PCV2 induction of ER stress and UPR also involves elevation of cytosolic calcium, which causes alteration of Ca²⁺ homeostasis leading to apoptosis (Zhang *et al.* 2019, Wang *et al.* 2021). Interestingly, some studies reported that *DUSP1* expression modulates apoptosis rate in different types of cells (Fu *et al.* 2019, Yang *et al.* 2019). Moreover, Robitaille *et al.* (2017) showed that *DUSP1* has a pro-apoptotic function independently of JNK and p38 pathways during SeV infection [45]. Considering

these observations, it could be interesting to determine whether *DUSP1* modulates PCV2b replication in NPTr-CD163 co-infected cells via modulation of apoptosis and ER stress.

On the other hand, the *in silico* analysis of protein-protein interaction networks on co-infected cells revealed that DUSP1 interacts with ribosomal protein RLP38 and SSR4 TRAP subunit, which are both involved in the translocon complex. Particularly, SSR4 (TRAP δ) is part of the transmembrane translocon-associated protein (TRAP) complex. The TRAP complex interacts with the Sec61 protein-conducting channel as well as with ribosomal protein L38 (RPL38) (Hamman *et al.* 1997, Van Coppenolle *et al.* 2004, Karki *et al.* 2022). According to Karki *et al.* (2022), the association of TRAP and the ribosome possesses a role in protein translocation into the ER. These authors have reported that TRAP stabilizes the ribosome exit tunnel for favorable polypeptide insertion through Sec61 and that the TRAP/ribosome complex promotes the open gate of the Sec61 channel (Karki *et al.* 2022). It has been found that the pore diameter of the Sec61 complex is larger in the ribosome-bound state than in the ribosome-free state, allowing Ca²⁺ leakage (Hamman *et al.* 1997, Van Coppenolle *et al.* 2004). Moreover, it is known that Sec61 translocon complex has a role in ER stress induction. In ER stress conditions, the UPR is activated to restore ER homeostasis (Sicari *et al.* 2020). However, if ER stress conditions persists, the UPR triggers apoptosis (Adams *et al.* 2019, Read and Schröder 2021). The results of the protein-protein interaction networks analysis in the present study raise the question of whether DUSP1 binding to RPL38 and SSR4 (TRAP δ) might have an impact on the stabilization of the ribosome-translocon complex, affecting the dynamics of protein translocation or Ca²⁺ leakage from the ER and ultimately the ER homeostasis. Overall, further studies are needed to confirm if *DUSP1* up-regulation in PCV2b/PRRSV co-infected cells mediates PCV2b enhanced replication via ER stress, UPR and apoptotic pathways.

5. Conclusions

In the current study, NPTr-CD163 cells were used as an *in vitro* model to study PCV2b/PRRSV co-infection. Our results confirmed that in cells previously infected with PCV2b, a subsequent infection with PRRSV can enhance PCV2b replication, whereas PRRSV replication is negatively impacted. Differential modulation of cytokines transcriptional expression and cellular genes having a role in virus replication could explain this effect in co-infected NPTr-CD163 cells. Specifically, this study highlights a possible role of *DUSP1* in the modulation of PCV2b replication

in PCV2b/PRRSV dually infected cells. Overall, our results provide new insights on PCV2b and PRRSV interactions.

Author Contributions

Yaima Burgher: Development of all the protocols, acquisition, analysis and interpretation of all the results, writing original draft and revision of the manuscript.

Dr Chantale Provost: Project and protocols design, optimization of the library preparation and sequencing, revision of the manuscript.

Dr. Fernando Alvarez: Optimization of protocols and viral infections.

Europa Meza and Dr Christopher A. Price: Optimization and development of western blot assays.

Marie-Jeanne Pesant: Virus production, sequencing data analysis and revision of the manuscript.

Dr. Carl A. Gagnon: Design of the project and the experiments, funding acquisition, interpretation of the results, revising the manuscript.

Funding

This project was funded by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) discovery grant (number RGPIN-2017-05240). C.A. Gagnon was financially supported by a Canadian Swine Research and Development Cluster (CSRDC) research project, Les éleveurs de porcs du Québec and by Probiotech International (number 1781). Y. Burgher and M.J. Pesant were recipients of a graduate student scholarship from the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologie (FRQNT). Both were also recipients of graduate student scholarships from the Swine and poultry infectious diseases research center (Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole, CRIPA-FRQ) and of different graduate student merit scholarships for Graduate and Postdoctoral Studies from the Université de Montréal.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the support of current and former post-graduate students of Dr Gagnon's Laboratories, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Acosta-Alvear, D., Karagöz, G. E., Fröhlich, F., Li, H., Walther, T. C. and Walter, P. (2018). "The unfolded protein response and endoplasmic reticulum protein targeting machineries converge on the stress sensor IRE1." Elife **7**: e43036.
- Adams, C. J., Kopp, M. C., Larburu, N., Nowak, P. R. and Ali, M. M. (2019). "Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1." Frontiers in Molecular Biosciences **6**: 11.
- Allan, G. M. and Ellis, J. A. (2000). "Porcine circoviruses: a review." J Vet Diagn Invest **12**(1): 3-14.
- Allan, G. M., McNeilly, E., Kennedy, S., Meehan, B., Moffett, D., Malone, F., Ellis, J. and Krakowka, S. (2000). "PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome." Vet Rec **146**(24): 711-712.
- Allan, G. M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I. and Kennedy, S. (2000). "Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication." Arch Virol **145**(11): 2421-2429.
- Alvarez, F. (2014). "Création d'un modèle cellulaire des voies respiratoires du porc pour étudier les effets d'une co-infection virale au virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin et au circovirus porcin." Master thesis in Papyrus : Institutional Repository of Université de Montréal, Montréal, Canada.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S. and Eppig, J. T. (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology." Nature genetics **25**(1): 25-29.
- Brockmeier, S. L., Halbur, P. G. and Thacker, E. L. (2002). "Porcine respiratory disease complex." Wiley Online Library. Hoboken, NJ, USA: 231-258.
- Brockmeier, S. L., Loving, C. L., Eberle, K. C., Hau, S. J., Buckley, A., Van Geelen, A., Montiel, N. A., Nicholson, T. and 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." Vet Microbiol **212**: 48-51.
- Cáceres, A., Perdiguero, B., Gómez, C. E., Cepeda, M. V., Caelles, C., Sorzano, C. O. and Esteban, M. (2013). "Involvement of the cellular phosphatase DUSP1 in vaccinia virus infection." PLoS pathogens **9**(11): e1003719.
- Chang, H. W., Jeng, C. R., Liu, J. J., Lin, T. L., Chang, C. C., Chia, M. Y., Tsai, Y. C. and Pang, V. F. (2005). "Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha." Vet Microbiol **108**(3-4): 167-177.
- Choi, J. E., Kwon, J. H., Kim, J.-H., Hur, W., Sung, P. S., Choi, S. W. and Yoon, S. K. (2015). "Suppression of dual specificity phosphatase I expression inhibits hepatitis C virus replication." PLoS One **10**(3): e0119172.
- Costa, E. A., Subramanian, K., Nunnari, J. and Weissman, J. S. (2018). "Defining the physiological role of SRP in protein-targeting efficiency and specificity." Science **359**(6376): 689-692.
- Dan, A., Molnar, T., Biksi, I., Glavits, R., Shaheim, M. and Harrach, B. (2003). "Characterisation of Hungarian porcine circovirus 2 genomes associated with PMWS and PDNS cases." Acta Vet Hung **51**(4): 551-562.

Dea, S., Gagnon, C. A., Mardassi, H. and Milane, G. (1996). "Antigenic variability among North American and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein." J Clin Microbiol **34**(6): 1488-1493.

Diaz, I., Gimeno, M., Darwich, L., Navarro, N., Kuzemtseva, L., Lopez, S., Galindo, I., Segales, J., Martin, M., Pujols, J. and Mateu, E. (2012). "Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection." Vet Res **43**: 30.

Dorr, P. M., Baker, R. B., Almond, G. W., Wayne, S. R. and Gebreyes, W. A. (2007). "Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine." J Am Vet Med Assoc **230**(2): 244-250.

Du, Q., Huang, Y., Wang, T., Zhang, X., Chen, Y., Cui, B., Li, D., Zhao, X., Zhang, W., Chang, L. and Tong, D. (2016). "Porcine circovirus type 2 activates PI3K/Akt and p38 MAPK pathways to promote interleukin-10 production in macrophages via Cap interaction of gC1qR." Oncotarget **7**(14): 17492-17507.

Fan, P., Wei, Y., Guo, L., Wu, H., Huang, L., Liu, J. and Liu, C. (2013). "Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2." Virology **10**: 265.

Fraile, L., Calsamiglia, M., Mateu, E., Espinal, A., Cuxart, A., Seminati, C., Martin, M., Domingo, M. and Segales, J. (2009). "Prevalence of infection with porcine circovirus-2 (PCV-2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in an integrated swine production system experiencing postweaning multisystemic wasting syndrome." Can J Vet Res **73**(4): 308-312.

Franzo, G. and Segales, J. (2018). "Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology." PLoS One **13**(12): e0208585.

Fu, X.-h., Chen, C.-z., Li, S., Han, D.-x., Wang, Y.-j., Yuan, B., Gao, Y., Zhang, J.-b. and Jiang, H. (2019). "Dual-specificity phosphatase 1 regulates cell cycle progression and apoptosis in cumulus cells by affecting mitochondrial function, oxidative stress, and autophagy." American Journal of Physiology-Cell Physiology **317**(6): C1183-C1193.

Gagnon, C. A., Lachapelle, G., Langelier, Y., Massie, B. and Dea, S. (2003). "Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions." Arch Virol **148**(5): 951-972.

Gagnon, C. A., Tremblay, D., Tijssen, P., Venne, M. H., Houde, A. and Elahi, S. M. (2007). "The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada." Can Vet J **48**(8): 811-819.

Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X., Pelzer, K. and Buechner - Maxwell, V. (2009). "Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus - associated disease." Journal of veterinary internal medicine **23**(6): 1151-1163.

Goel, S., Saheb Sharif-Askari, F., Saheb Sharif Askari, N., Madkhana, B., Alwaa, A. M., Mahboub, B., Zakeri, A. M., Ratemi, E., Hamoudi, R. and Hamid, Q. (2021). "SARS-CoV-2 Switches 'on' MAPK and NFκB Signaling via the Reduction of Nuclear DUSP1 and DUSP5 Expression." Frontiers in Pharmacology **12**: 631879.

Gu, C., Gao, X., Guo, D., Wang, J., Wu, Q., Nepovimova, E., Wu, W. and Kuca, K. (2021). "Combined Effect of Deoxynivalenol (DON) and Porcine Circovirus Type 2 (Pcv2) on Inflammatory Cytokine mRNA Expression." Toxins (Basel) **13**(6).

Günther, J. and Seyfert, H.-M. (2018). "The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells." Seminars in immunopathology **40**(6): 555-565.

Halbur, P. G., Andrews, J. J., Huffman, E. L., Paul, P. S., Meng, X. J. and Niyo, Y. (1994). "Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung." J Vet Diagn Invest **6**(2): 254-257.

Hamman, B. D., Chen, J.-C., Johnson, E. E. and Johnson, A. E. (1997). "The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40–60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane." Cell **89**(4): 535-544.

Hernandez Reyes, Y., Provost, C., Traesel, C. K., Jacques, M. and Gagnon, C. A. (2018). "Actinobacillus pleuropneumoniae culture supernatant antiviral effect against porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs prior to the viral genome replication and transcription through actin depolymerization." J Med Microbiol **67**(2): 249-264.

Hu, Y., Zhan, Y., Wang, D., Xie, X., Liu, T., Liu, W., Wang, N., Deng, Z., Lei, H., Yang, Y. and Wang, A. (2017). "Evidence of natural co-infection with PCV2b subtypes in vivo." Arch Virol **162**(7): 2015-2020.

Huang, D., Sherman, B. and Lempicki, R. (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources." Nature Protoc. **4**(1): 44-57.

Kärber, G. (1931). "Tabellen zur näherungsweise Bestimmung von Titern." Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. **162**: 480.

Karki, S., Javanainen, M., Tranter, D., Rehan, S., Huiskonen, J. T., Happonen, L. and Paavilainen, V. (2022). "Molecular view of ER membrane remodeling by the Sec61/TRAP translocon." bioRxiv.

Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., Fossum, C., Segales, J. and Allan, G. M. (2010). "Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2." Vet Immunol Immunopathol **136**(3-4): 185-193.

Kim, J., Chung, H. K. and Chae, C. (2003). "Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex." Vet J **166**(3): 251-256.

Lefkowitz, E., Dempsey, D., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G. and Smith, D. B. (2017). "Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)." Nucleic Acids Research **46**(D1): D708–D717.

Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G. and Smith, D. B. (2018). "Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)." Nucleic acids research **46**(D1): D708-D717.

Levesque, C., Provost, C., Labrie, J., Hernandez Reyes, Y., Burciaga Nava, J. A., Gagnon, C. A. and Jacques, M. (2014). "Actinobacillus pleuropneumoniae possesses an antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus." PLoS One **9**(5): e98434.

Lévesque, C., Provost, C., Labrie, J., Hernandez Reyes, Y., Burciaga Nava, J. A., Gagnon, C. A. and Jacques, M. (2014). "Actinobacillus pleuropneumoniae possesses an antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus." PLoS One **9**(5): e98434.

Link, E. K., Eddicks, M., Nan, L., Ritzmann, M., Sutter, G. and Fux, R. (2021). "Discriminating the eight genotypes of the porcine circovirus type 2 with TaqMan-based real-time PCR." Virology **18**(1): 70.

Liu, S., Li, Q., Qiao, J., Wang, J., Cui, D., Gu, K., Zhou, S. and Li, H. (2019). "Endothelial IL-8 induced by porcine circovirus type 2 affects dendritic cell maturation and antigen-presenting function." Virology **16**(1): 154.

Liu, Y., Du, Y., Wang, H., Du, L. and Feng, W. H. (2017). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) up-regulates IL-8 expression through TAK-1/JNK/AP-1 pathways." Virology **506**: 64-72.

Meerts, P., Misinzo, G. and Nauwynck, H. (2005). "Enhancement of porcine circovirus 2 replication in porcine cell lines by IFN- γ before and after treatment and by IFN- α after treatment." Journal of interferon **25**(11): 684-693.

Meier, W. A., Galeota, J., Osorio, F. A., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M. and 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**(1): 18-31.

Miller, L. C., Fleming, D. S. and Lager, K. M. (2020). "Comparison of the Transcriptome Response within the Swine Tracheobronchial Lymphnode Following Infection with PRRSV, PCV-2 or IAV-S." Pathogens **9**(2).

Murira, A. and Lamarre, A. (2016). "Type-I interferon responses: from friend to foe in the battle against chronic viral infection." Frontiers in immunology **7**: 609.

Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., Green, A. L. and 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**(3): 385-392.

Niu, G., Chen, S., Li, X., Zhang, L. and Ren, L. (2022). "Advances in Crosstalk between Porcine Circoviruses and Host." Viruses **14**(7): 1419.

Opriessnig, T., Gauger, P. C., Faaberg, K. S., Shen, H., Beach, N. M., Meng, X. J., Wang, C. and Halbur, P. G. (2012). "Effect of porcine circovirus type 2a or 2b on infection kinetics and pathogenicity of two genetically divergent strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the conventional pig model." Vet Microbiol **158**(1-2): 69-81.

Opriessnig, T., Gimenez-Lirola, L. G. and Halbur, P. G. (2011). "Polymicrobial respiratory disease in pigs." Anim Health Res Rev **12**(2): 133-148.

Opriessnig, T. and Halbur, P. G. (2012). "Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease." Virus Res **164**(1-2): 20-32.

Opriessnig, T., Madson, D. M., Prickett, J. R., Kuhar, D., Lunney, J. K., Elsener, J. and Halbur, P. G. (2008). "Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection." Vet Microbiol **131**(1-2): 103-114.

Oshlack, A., Robinson, M. D. and Young, M. D. (2010). "From RNA-seq reads to differential expression results." Genome biology **11**: 1-10.

Ouyang, Y., Xu, L., Lv, J., Hou, Y., Fan, Z., Xu, P., Jiang, Y., Wu, M., Li, R., Zhang, Y. and Guo, K. (2019). "Porcine circovirus type 2 ORF5 protein induces endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in porcine alveolar macrophages." Arch Virol **164**(5): 1323-1334.

Pallares, F. J., Halbur, P. G., Opriessnig, T., Sorden, S. D., Villar, D., Janke, B. H., Yaeger, M. J., Larson, D. J., Schwartz, K. J., Yoon, K. J. and Hoffman, L. J. (2002). "Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)." J Vet Diagn Invest **14**(6): 515-519.

Pan, Y., Li, P., Jia, R., Wang, M., Yin, Z. and Cheng, A. (2018). "Regulation of Apoptosis During Porcine Circovirus Type 2 Infection." Front Microbiol **9**: 2086.

Park, C., Seo, H. W., Park, S. J., Han, K. and Chae, C. (2014). "Comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated lesions produced by co-infection between two genotypes of PCV2 and two

genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus." J Gen Virol **95**(Pt 11): 2486-2494.

Patel, D., Nan, Y., Shen, M., Ritthipichai, K., Zhu, X. and Zhang, Y. J. (2010). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation." J Virol **84**(21): 11045-11055.

Plumb, R., Zhang, Z.-R., Appathurai, S. and Mariappan, M. (2015). "A functional link between the co-translational protein translocation pathway and the UPR." Elife **4**: e07426.

Pol, J., Van Dijk, J., Wensvoort, G. and Terpstra, C. (1991). "Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS))." Veterinary Quarterly **13**(3): 137-143.

Pomorska-Mól, M., Markowska-Daniel, I., Kwit, K., Czyżewska, E., Dors, A., Rachubik, J. and Pejsak, Z. (2014). "Immune and inflammatory response in pigs during acute influenza caused by H1N1 swine influenza virus." Archives of virology **159**: 2605-2614.

Provost, C., Hamonic, G., Gagnon, C. A. and Meurens, F. (2017). "Dual infections of CD163 expressing NPTr epithelial cells with influenza A virus and PRRSV." Veterinary microbiology **207**: 143-148.

Provost, C., Jia, J. J., Music, N., Lévesque, C., Lebel, M.-È., del Castillo, J. R., Jacques, M. and Gagnon, C. A. (2012). "Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line." Virology journal **9**(1): 1-14.

Read, A. and Schröder, M. (2021). "The unfolded protein response: An overview." Biology **10**(5): 384.

Robinson, M. D. and Oshlack, A. (2010). "A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data." Genome biology **11**(3): 1-9.

Robitaille, A. C., Caron, E., Zucchini, N., Mukawera, E., Adam, D., Mariani, M. K., Gélinas, A., Fortin, A., Brochiero, E. and Grandvaux, N. (2017). "DUSP1 regulates apoptosis and cell migration, but not the JIP1-protected cytokine response, during Respiratory Syncytial Virus and Sendai Virus infection." Scientific reports **7**(1): 1-15.

Rossow, K. D., Benfield, D. A., Goyal, S. M., Nelson, E. A., Christopher-Hennings, J. and Collins, J. E. (1996). "Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs." Vet Pathol **33**(5): 551-556.

Rovira, A., Balasch, M., Segales, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A. and Domingo, M. (2002). "Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2." Journal of virology **76**(7): 3232-3239.

Sang, Y., Rowland, R. R. and Blecha, F. (2011). "Interaction between innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus." Anim Health Res Rev **12**(2): 149-167.

Savard, C., Provost, C., Alvarez, F., Pinilla, V., Music, N., Jacques, M., Gagnon, C. A. and Chorfi, Y. (2015). "Effect of deoxynivalenol (DON) mycotoxin on in vivo and in vitro porcine circovirus type 2 infections." Veterinary microbiology **176**(3-4): 257-267.

Segales, J., Calsamiglia, M., Rosell, C., Soler, M., Maldonado, J., Martin, M. and Domingo, M. (2002). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain." Vet Microbiol **85**(1): 23-30.

Shi, K., Li, H., Guo, X., Ge, X., Jia, H., Zheng, S. and Yang, H. (2008). "Changes in peripheral blood leukocyte subpopulations in piglets co-infected experimentally with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2." Vet Microbiol **129**(3-4): 367-377.

Sicari, D., Delaunay - Moisan, A., Combettes, L., Chevet, E. and Igbaria, A. (2020). "A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems." The FEBS Journal **287**(1): 27-42.

Sinha, A., Shen, H. G., Schalk, S., Beach, N. M., Huang, Y. W., Meng, X. J., Halbur, P. G. and Opriessnig, 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**(3-4): 235-246.

Sirinarumitr, T., Sorden, S. D., Morozov, I. and Paul, P. S. (2001). "Double in situ hybridization for simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus (PCV)." J Vet Diagn Invest **13**(1): 68-71.

Solano, G. I., Segalés, J., Collins, J. E., Molitor, T. W. and Pijoan, C. (1997). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with Haemophilus parasuis." Veterinary Microbiology **55**(1-4): 247-257.

Song, S., Bi, J., Wang, D., Fang, L., Zhang, L., Li, F., Chen, H. and Xiao, S. (2013). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection activates IL-10 production through NF-kappaB and p38 MAPK pathways in porcine alveolar macrophages." Dev Comp Immunol **39**(3): 265-272.

Sorden, S., Harms, P., Sirinarumitr, T., Morozov, I., Halbur, P., Yoon, K. and Paul, P. (1998). "Porcine circovirus and PRRSV co-infection in pigs with chronic bronchointerstitial pneumonia and lymphoid depletion: an emerging syndrome in midwestern swine." Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Minneapolis, Minn: 75.

Spearman, C. (1909). "Review of The Method of 'Right and Wrong Cases' ('Constant Stimuli') without Gauss's Formula." Psychol Bull **6**(1): 27-28.

Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N. and Šmuc, T. (2011). "REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms." PLoS ONE **6**(7).

Suradhat, S., Thanawongnuwech, R. and Poovorawan, Y. (2003). "Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus." J Gen Virol **84**(Pt 2): 453-459.

Teijaro, J. R. (2016). "Type I interferons in viral control and immune regulation." Current opinion in virology **16**: 31-40.

Thanawongnuwech, R., Brown, G., Halbur, P., Roth, J., Royer, R. and Thacker, B. (2000). "Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to Streptococcus suis infection." Veterinary pathology **37**(2): 143-152.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P. G. and Thacker, E. L. (2000). "The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection." Anim Health Res Rev **1**(2): 95-102.

The-Gene-Ontology-Consortium (2021). "The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine " Nucleic acids research **49**(D1): D325-D334.

Thomson, J., Smith, B., Allan, G., McNeilly, F. and McVicar, C. (2000). "PDNS, PMWS and porcine circovirus type 2 in Scotland. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Post-weaning multisystemic wasting syndrome." Vet Rec **146**(22): 651-652.

Tsai, Y. C., Chang, H. W., Jeng, C. R., Lin, T. L., Lin, C. M., Wan, C. H. and Pang, V. F. (2012). "The effect of infection order of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on dually infected swine alveolar macrophages." BMC Vet Res **8**: 174.

Turlewicz-Podbielska, H., Czyżewska-Dors, E. and Pomorska-Mól, M. (2021). "Respiratory viral infections drive different lung cytokine profiles in pigs." BMC veterinary research **17**(1): 1-8.

Van Coppenolle, F., Vanden Abeele, F., Slomianny, C., Flourakis, M., Hesketh, J., Dewailly, E. and Prevarskaya, N. (2004). "Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores." Journal of cell science **117**(18): 4135-4142.

Van Reeth, K., Van Gucht, S., Pensaert, M. and immunopathology (2002). "In vivo studies on cytokine involvement during acute viral respiratory disease of swine: troublesome but rewarding." Veterinary immunology **87**(3-4): 161-168.

Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M. R. and Regamey, N. (2011). "The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses." Clinical microbiology reviews **24**(1): 210-229.

Walia, R., Dardari, R., Chaiyakul, M. and Czub, M. (2014). "Porcine circovirus-2 capsid protein induces cell death in PK15 cells." Virology **468-470**: 126-132.

Wang, S., Li, C., Sun, P., Shi, J., Wu, X., Liu, C., Peng, Z., Han, H., Xu, S., Yang, Y., Tian, Y., Li, J., He, H., Li, J. and Wang, Z. (2021). "PCV2 Triggers PK-15 Cell Apoptosis Through the PLC-IP3R-Ca(2+) Signaling Pathway." Front Microbiol **12**: 674907.

Wang, Y., Noll, L., Lu, N., Porter, E., Stoy, C., Zheng, W., Liu, X., Peddireddi, L., Niederwerder, M. and Bai, J. (2020). "Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016-2018." Transbound Emerg Dis **67**(3): 1284-1294.

Wellenberg, G. J., Stockhofe-Zurwieden, N., Boersma, W. J., De Jong, M. F. and Elbers, A. R. (2004). "The presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: a case-control study." Res Vet Sci **77**(2): 177-184.

Wesley, R. D., Lager, K. M. and Kehrli, M. E., Jr. (2006). "Infection with Porcine reproductive and respiratory syndrome virus stimulates an early gamma interferon response in the serum of pigs." Can J Vet Res **70**(3): 176-182.

Wilczek, M. P., Armstrong, F. J., Geohegan, R. P., Mayberry, C. L., DuShane, J. K., King, B. L. and Maginnis, M. S. (2021). "The MAPK/ERK Pathway and the Role of DUSP1 in JCPyV Infection of Primary Astrocytes." Viruses **13**(9): 1834.

Wilkinson, J. M., Gunvaldsen, R. E., Detmer, S. E., Dyck, M. K., Dixon, W. T., Foxcroft, G. R., Plastow, G. S. and Harding, J. C. (2015). "Transcriptomic and epigenetic profiling of the lung of influenza-infected pigs: a comparison of different birth weight and susceptibility groups." PLoS One **10**(9): e0138653.

Xu, Y., Wang, H., Zhang, X., Zheng, X., Zhu, Y., Han, H. and Feng, W. H. (2021). "Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) induces IL-6 production through TAK-1/JNK/AP-1 and TAK-1/NF-kappaB signaling pathways." Vet Microbiol **256**: 109061.

Yang, J., Sun, L., Han, J., Zheng, W. and Peng, W. (2019). "DUSP1/MKP-1 regulates proliferation and apoptosis in keratinocytes through the ERK/Elk-1/Egr-1 signaling pathway." Life sciences **223**: 47-53.

Yi, J. and Liu, C. (2010). "Molecular characterization of porcine circovirus 2 isolated from diseased pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus." Virology Journal **7**: 1-4.

Yu, J., Wu, J., Zhang, Y., Guo, L., Cong, X., Du, Y., Li, J., Sun, W., Shi, J. and Peng, J. (2012). "Concurrent highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection

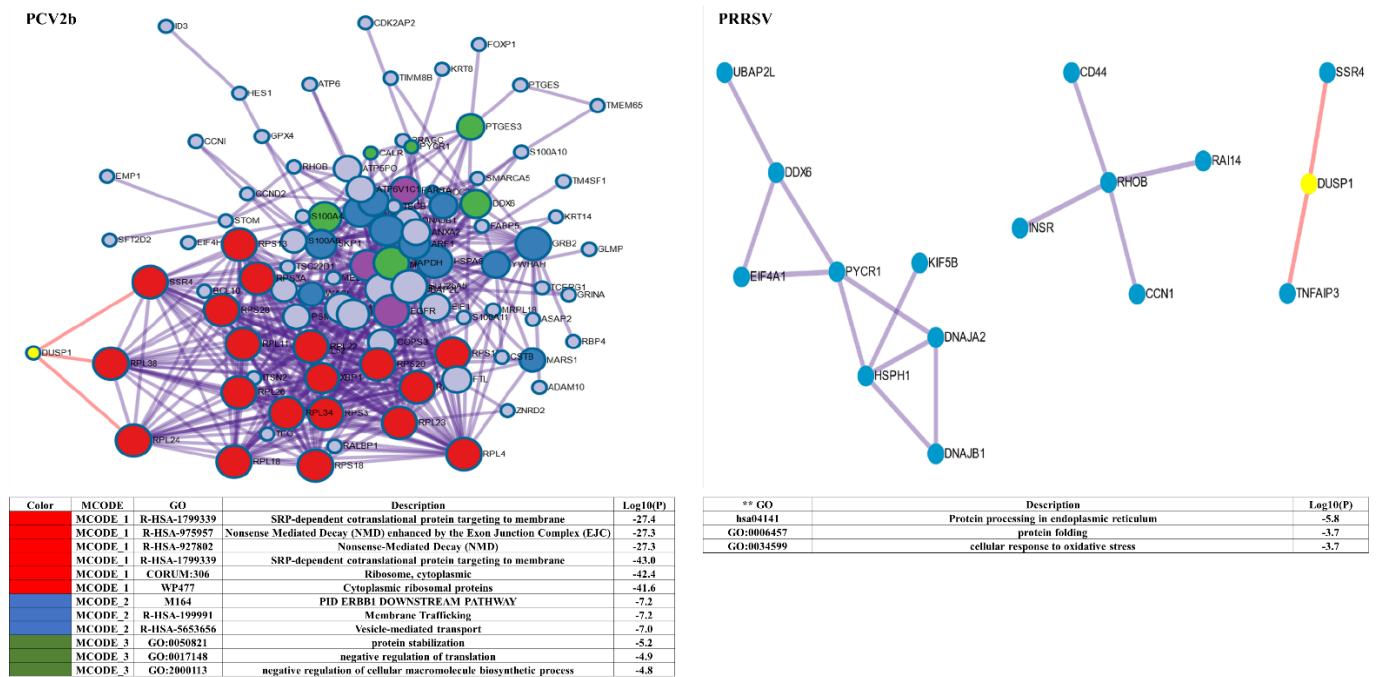
accelerates Haemophilus parasuis infection in conventional pigs." Veterinary microbiology **158**(3-4): 316-321.

Zhang, Y., Sun, R., Geng, S., Shan, Y., Li, X. and Fang, W. (2019). "Porcine Circovirus Type 2 Induces ORF3-Independent Mitochondrial Apoptosis via PERK Activation and Elevation of Cytosolic Calcium." J Virol **93**(7).

Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., Benner, C. and Chanda, S. K. (2019). "Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets." Nature communications **10**(1): 1-10.

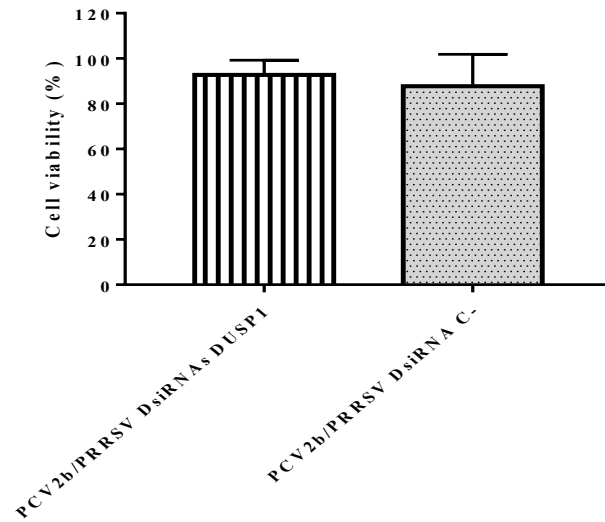
Zhu, Z., Liu, P., Yuan, L., Lian, Z., Hu, D., Yao, X. and Li, X. J. F. i. M. (2021). "Induction of UPR Promotes Interferon Response to Inhibit PRRSV Replication via PKR and NF- κ B Pathway." 2995.

Supplemental figures



Supplemental figure S1: Protein network analysis with the DEGs identified in PCV2b and PRRSV single infected cells. Predicted physical protein-protein interactions (PPI) between the corresponding proteins of the identified DEGs in PCV2b and PRRSV infected cells is shown. Molecular Complex Detection (MCODE) algorithm was applied to identify densely connected network components. Each MCODE network is assigned a unique color. Pathway and process enrichment analysis has been applied to each MCODE component independently. The table shows the best-scoring terms by p-value retained as the functional description of the corresponding MCODE components.

** No MCODE component was identified for PRRSV infected cells. The table shows the pathway/process enriched in the list of DEGs identified in PRRSV infected cells.



Supplemental figure S2. DsiRNAs targeted *DUSP1* does not impact cell viability. Cell viability was determined at 72 hours in PCV2b/PRRSV co-infected and/or transfected cells. The data represents the percentage of cell viability in transfected co-infected cells with respect to non-transfected co-infected cells and are presented with standard deviation (SD) of three biological replicates. Significant statistical differences between *DUSP1*-DsiRNAs-transfected-cells and scrambled DsiRNAs-transfected-cells were determined using a paired t test statistical analysis.

Supplemental table S1.

List of primers and probes used for PCV2b and PRRSV genome quantification, and for cytokines mRNA relative expression quantification in NPTr-CD163 infected cells

Target	Primers and probes 5'- 3'	References
PCV2b (ORF1)	F: GGC CAC CTG GGT GTG GTA AA R: CCC ACC ACT TGT TTC TAG GTG GTT Probe 6-FAM-TTT GCA GAC CCG GAA ACC ACA TAC TGG A-BHQ-1)	[55]
PRRSV (ORF6)	F: 5' GCT TTC ATC CGA TTG CGG CAA RTG A -3' R: 5' CAC CAA TGT GCC GTT RAC CGT AGT -3' Probe: 5'-(6-FAM) TAA CCA CGC ATT TGT CGT CCG GCG T (BHQ1)-3'	
IL-6	F: ACTCCCTCTCCACAAGCGCCTT R: TGGCATCTTCTCCAGGCGTCCC	[55]
IL-8	F: TGTGAGGCTGCAGTTCTGGCAAG R: GGGTGGAAGGTGTGGAATGCGT	
IL-10	F: GCTGCGGCGCTGTCATCAATT R: GCTGCGGCGCTGTCATCAATT	
IFN- α	F: ACTCCATCCTGGCTGTGAGGAAAT R: TCTGTCTTGACAGTTTGTGGAGGA	[56]
IFN- β	F: CTCTCCTGATGTGTTTCTCC R: GTTCATCCTATCTTCGAGGC	
IFN- γ	F: GAGCCAAATTGTCTCCTTCTAC R: CGAAGTCATTGATTTCCAG	
B2M	F: GTGCTATCTCCACGTTTGAG R: GCTTCGAGTGCAAGAGATTG 5'-(6-FAM) TCACTGTCTGGCCTGGATGCGGTTCG (BHQ1)-3'	
B-actin	F: ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT R: ATCTTCATGAGGTAGTCGGTCAGG 5'-(6-FAM) ACCCACACGGTGCCCATCTACGAGG (BHQ1)-3'	
PPIA	F: TGCAGACAAAGTTCAAAGACAG R: GCCACCAAGTCCATTATGG 5'-(6-FAM) TCCAGGATTTATGTGCCAGGGTGGT (BHQ1)-3'	
DUSP1	F: TGTCGCTCCTTCTTCGCTTT R: CGGGCAGGAAACAGAAAAAGC	This study
DsiRNA DUSP1 #10	SEQ1: AGGGUCACUACCAGUACAAGAGCAT SEQ2: AUGCUCUUGUACUGGUAGUGACCCUCA	Integrated DNA Technologies, IDT, CA USA
DsiRNA DUSP1 #12	SEQ1: ACAGUGCGUUGAGCUACCUUCAGAG SEQ2: CUCUGAAGGUAGCUAACGCACUGUUC	Integrated DNA Technologies, IDT, CA USA

Supplemental table S2.

Differentially expressed genes in PCV2b-, PRRSV- and PCV2b/PRRSV-infected NPTr-CD163 cells

I. Differentially expressed genes in PCV2b single infected NPTr-CD163 cells

PCV2b infected cells		
Gene name	Log ₂ (Fold change)	FDR p-value
RHOB	8,32	0,0005
gene:ENSSSCG00000000769	7,33	0,0072
ID3	7,30	0,0034
SKP1	6,88	0,0125
S100A4	6,67	0,0000
PYCR1	6,66	0,0001
ACADS	6,63	0,0277
TCERG1	6,59	0,0116
ELAC1	6,47	0,0227
COPS3	6,45	0,0006
OTUB1	6,43	0,0231
gene:ENSSSCG00000011000	6,41	0,0157
CSTB	6,38	0,0306
GLMP	6,35	0,0258
GRINA	6,29	0,0291
WASL	6,19	0,0277
CDK2AP2	6,16	0,0409
ATP6V1C1	6,14	0,0339
ASAP2	6,08	0,0031
gene:ENSSSCG00000030283	6,01	0,0413
FARSA	5,89	0,0460
MRPL18	5,73	0,0234
TMEM65	5,66	0,0157
RPS28	5,54	0,0000
SLC25A5	5,53	0,0027
gene:ENSSSCG00000039004	5,51	0,0219
BCAS4	5,32	0,0218
SELENOS	5,30	0,0003
RALBP1	5,29	0,0000
DUSP1	5,25	0,0046
STOM	5,23	0,0187
SFT2D2	5,09	0,0229
UBAP2L	4,81	0,0148
PTGES	4,79	0,0357
HES1	4,76	0,0000
SSR4	4,75	0,0000
CDKN2AIPNL	4,68	0,0011
TGIF2-RAB5IF	4,62	0,0230

RRAGC	4,58	0,0409
THOC2	4,44	0,0002
DNAJB1	4,38	0,0089
RPL18	4,38	0,0008
MTHFD1	4,33	0,0392
GPX4	4,21	0,0219
HSPB1	4,20	0,0000
KRT14	4,16	0,0070
RPL22	4,11	0,0000
S100A10	4,10	0,0003
CCND2	4,06	0,0092
FOXP1	3,99	0,0074
YWHAH	3,88	0,0088
NDUFB3	3,85	0,0008
ETV3	3,84	0,0218
FABP5	3,80	0,0289
MARS	3,79	0,0407
ADAM10	3,77	0,0218
BCL10	3,74	0,0493
ITSN2	3,72	0,0115
MRPL52	3,62	0,0463
KLF7	3,62	0,0159
TBCB	3,62	0,0092
ZDHHC18	3,60	0,0013
TFG	3,53	0,0390
RPS15A	3,50	0,0238
gene:ENSSSCG00000050998	3,50	0,0064
RPL38	3,48	0,0000
TSC22D1	3,48	0,0230
RPL23	3,47	0,0000
CS	3,44	0,0113
MED8	3,43	0,0364
TM4SF1	3,41	0,0008
TXNIP	3,40	0,0161
SQSTM1	3,39	0,0025
DDX6	3,33	0,0018
RAB5A	3,32	0,0289
PTGES3	3,30	0,0218
AVPI1	3,28	0,0070
gene:ENSSSCG00000038507	3,25	0,0000
gene:ENSSSCG00000006081	3,25	0,0088
ARF1	3,24	0,0237
XBP1	3,16	0,0401
gene:ENSSSCG00000025060	3,09	0,0237
ERBB3	3,08	0,0398
SMARCA5	3,07	0,0301
S100A6	3,07	0,0018

CALR	3,07	0,0161
ATP5PO	3,04	0,0411
KRT8	3,04	0,0006
gene:ENSSSCG00000003042	3,02	0,0009
gene:ENSSSCG00000004970	2,97	0,0038
gene:ENSSSCG00000002963	2,95	0,0291
EIF4H	2,90	0,0306
gene:ENSSSCG00000016737	2,86	0,0053
RPL11	2,85	0,0116
VEZF1	2,83	0,0294
MAP1B	2,82	0,0442
gene:ENSSSCG00000034617	2,81	0,0072
PSMD7	2,72	0,0125
ZFP36L1	2,69	0,0237
EIF1	2,61	0,0017
EMP1	2,60	0,0230
RPL24	2,57	0,0148
NME2	2,56	0,0289
ATP6	2,55	0,0269
RPS3	2,54	0,0157
GAPDH	2,54	0,0373
GRB2	2,52	0,0493
RPS18	2,46	0,0404
RPS3A	2,35	0,0080
RPL26	2,30	0,0218
gene:ENSSSCG00000032003	2,30	0,0390
RPL27	2,29	0,0145
RBP4	2,28	0,0157
RPS20	2,22	0,0289
RPS13	2,19	0,0407
ANXA2	2,15	0,0219
S100A11	2,11	0,0484
FTL	2,05	0,0234
HSPA8	2,00	0,0291
RPL34	1,89	0,0401
gene:ENSSSCG00000040056	-1,98	0,0440
RPL4	-2,22	0,0200
CCNI	-2,31	0,0300
TIMM8B	-2,46	0,0306
gene:ENSSSCG00000008274	-2,77	0,0088
EGFR	-3,59	0,0000
ZNRD2	-8,62	0,0303

II. Differentially expressed genes in PRRSV single infected NPTr-CD163 cells

PRRSV infected cells		
Gene name	Log ₂ (Fold change)	FDR p-value
INSR	7,63	0,0099
DUSP1	7,35	0,0000
TCERG1	7,03	0,0113
TNFAIP3	7,00	0,0000
DNAJB1	6,99	0,0000
RHOB	6,47	0,0445
CCN1	6,09	0,0000
NFKBIA	5,49	0,0000
SLC10A7	5,33	0,0478
PYCR1	5,13	0,0263
UBAP2L	4,92	0,0263
EGR1	4,85	0,0004
AMOTL2	4,42	0,0038
CCND2	4,34	0,0099
gene:ENSSSCG00000029160	4,03	0,0263
SSR4	4,00	0,0047
FOXP1	3,90	0,0229
DNAJA2	3,71	0,0379
gene:ENSSSCG00000038594	3,66	0,0028
SORBS2	3,40	0,0255
KIF5B	3,40	0,0263
CD44	3,25	0,0263
MKNK2	3,20	0,0111
HES1	3,11	0,0462
HSPH1	3,05	0,0185
RAI14	3,03	0,0307
gene:ENSSSCG00000033019	2,80	0,0131
DDX6	2,79	0,0462
EIF4A1	2,76	0,0185
SAMD12	-3,97	0,0103
PDZD11	-6,01	0,0058
SNRNP27	-6,38	0,0004

III. Differentially expressed genes in PCV2b/PRRSV co-infected NPTr-CD163 cells

PCV2b/PRRSV infected cells		
Gene name	Log ₂ (Fold change)	FDR p-value
ID3	7,44	0,0032
RHOB	7,43	0,0038
gene:ENSSSCG00000011000	7,08	0,0052
CDK2AP2	7,04	0,0138
CSTB	7,03	0,0147
PYCR1	6,92	0,0002
gene:ENSSSCG00000030283	6,75	0,0174
gene:ENSSSCG00000000769	6,69	0,0233
ELAC1	6,68	0,0192
TCERG1	6,60	0,0136
GLMP	6,54	0,0245
DDRKG1	6,52	0,0288
COPS3	6,52	0,0006
SKP1	6,34	0,0346
OTUB1	6,22	0,0402
S100A4	6,15	0,0003
MRPL18	6,14	0,0137
DUSP1	5,95	0,0006
BCAS4	5,72	0,0107
DNAJB1	5,52	0,0003
SLC25A5	5,50	0,0035
gene:ENSSSCG00000039004	5,23	0,0444
PTGES	5,02	0,0288
PPP2R1A	4,80	0,0474
SELENOS	4,75	0,0032
CDC37	4,75	0,0083
RPS28	4,72	0,0002
THOC2	4,45	0,0003
CDKN2AIPNL	4,42	0,0036
UBAP2L	4,35	0,0469
HES1	4,23	0,0003
SSR4	4,19	0,0009
S100A10	4,12	0,0003
DPF2	4,11	0,0444
HSPB1	4,05	0,0002
ZDHHC18	3,95	0,0003
RPL18	3,90	0,0065
RPL22	3,89	0,0002
YWHAH	3,86	0,0104
TBCB	3,76	0,0065
KRT14	3,66	0,0324
RALBP1	3,64	0,0157
MED8	3,61	0,0288
SLC22A18	3,59	0,0397
RPS15A	3,57	0,0247

NDUFB3	3,54	0,0041
AVPI1	3,51	0,0031
ITSN2	3,45	0,0288
SQSTM1	3,35	0,0035
TSC22D1	3,30	0,0466
gene:ENSSSCG00000016737	3,22	0,0008
TM4SF1	3,22	0,0031
ARF1	3,22	0,0317
S100A6	3,21	0,0009
RPL38	3,21	0,0003
gene:ENSSSCG00000025060	3,15	0,0243
gene:ENSSSCG0000002963	3,13	0,0210
gene:ENSSSCG00000050998	3,09	0,0288
gene:ENSSSCG00000038507	3,08	0,0002
SMARCA5	3,02	0,0466
NME2	2,93	0,0079
DDX6	2,86	0,0175
RPLP2	2,82	0,0182
gene:ENSSSCG00000034617	2,82	0,0076
RPL24	2,75	0,0070
KRT8	2,72	0,0043
EIF1	2,72	0,0009
RPL23	2,70	0,0070
GAPDH	2,68	0,0288
gene:ENSSSCG00000004970	2,63	0,0209
gene:ENSSSCG00000003042	2,56	0,0137
RPL27	2,48	0,0056
gene:ENSSSCG000000032003	2,39	0,0352
RPS3	2,31	0,0469
RPS3A	2,27	0,0138
LGALS3	2,23	0,0447
S100A11	2,22	0,0403
FTL	2,21	0,0136
RBP4	2,19	0,0288
HSPA8	2,15	0,0172
S100A5	2,12	0,0321
gene:ENSSSCG00000040056	-2,19	0,0229
EGFR	-3,02	0,0008
SBNO1	-4,34	0,0418

Supplemental table S3.

Distribution of differentially expressed genes (DEGs) in infected NPTr-CD163 cells according to the Venn diagram illustrated results

DEGs only identified in single PCV2b infected cells	ANXA2, ADAM10, RPL4, STOM, ZNRD2, RPS13, CALR, FARSA, GPX4, EIF4H, gene:ENSSSCG00000008274, ASAP2, GRINA, TMEM65, ATP6V1C1, gene:ENSSSCG00000006081, FABP5, RPS20, SFT2D2, ETV3, TXNIP, BCL10, ERBB3, CS, PTGES3, MARS, EMP1, PSMD7, RPL11, RRAGC, RPS18, MRPL52, MTHFD1, ZFP36L1, CCNI, RPL34, TIMM8B, GRB2, VEZF1, RPL26, RAB5A, TFG, ATP5PO, ACADS, XBP1, KLF7, MAP1B, TGIF2-RAB5IF, WASL, ATP6
DEGs only identified in single PRRSV infected cells	TNFAIP3, gene:ENSSSCG00000033019, CD44, INSR, MKNK2, EGR1, SNRNP27, SAMD12, CCN1, DNAJA2, gene:ENSSSCG00000029160, NFKBIA, SLC10A7, KIF5B, HSPH1, EIF4A1, AMOTL2, SORBS2, RAI14, gene:ENSSSCG00000038594, PDZD11
DEGs only identified in PCV2b/PRRSV infected cells	LGALS3, RPLP2, SLC22A18, DPF2, CDC37, S100A5, PPP2R1A, SBNO1, DDRGK1
DEGs identified in PCV2b and PRRSV infected cells	CCND2, FOXP1
DEGs identified in PCV2b and PCV2b/PRRSV infected cells	MRPL18, ELAC1, SELENOS, gene:ENSSSCG00000004970, gene:ENSSSCG00000038507, PTGES, gene:ENSSSCG00000032003, CDK2AP2, OTUB1, ARF1, RPS28, SQSTM1, SKP1, CDKN2AIPNL, HSPB1, RPS15A, gene:ENSSSCG00000034617, , gene:ENSSSCG00000039004, ITSN2, GLMP, S100A4, S100A6, S100A11, S100A10, KRT8, gene:ENSSSCG00000050998, GAPDH, gene:ENSSSCG00000000769, , gene:ENSSSCG00000040056, TBCB, gene:ENSSSCG00000002963, gene:ENSSSCG0000003042, RPL18, FTL, RPL22, ID3, ZDHHC18, RALBP1, MED8, RPS3A, SMARCA5, RPS3, HSPA8, EGFR, gene:ENSSSCG00000011000, TSC22D1, RPL38, RPL27, EIF1, KRT14, RPL23, NME2, COPS3, TM4SF1, RPL24, CSTB, YWHAH, RBP4, AVPI1, NDUFB3, BCAS4, gene:ENSSSCG00000016737, gene:ENSSSCG00000025060, gene:ENSSSCG00000030283, SLC25A5, THOC2
DEGs identified in PCV2b, PRRSV and PCV2b/PRRSV infected cells	DNAJB1, TCEG1, RHOB, UBAP2L, DDX6, PYCR1, HES1, DUSP1, SSR4

5.2 Deuxième article. Porcine circovirus modulates swine influenza virus replication in pig tracheal epithelial cells and porcine alveolar macrophages

Cet article, dont nous sommes quatre auteurs, a pour but de caractériser et de comparer l'effet de la co-infection PCV2b/VIP sur la réplication virale et les réponses des cellules hôtes infectées dans deux modèles de cellules respiratoires porcines (NPT_r et iPAM 3D4/21). Également, l'étude vise à identifier les gènes et les voies cellulaires modulés lors de cette co-infection.

Cet article a été publié au journal *Viruses* (**Burgher Pulgaron Y, Provost C, Pesant MJ, Gagnon CA. Porcine Circovirus Modulates Swine Influenza Virus Replication in Pig Tracheal Epithelial Cells and Porcine Alveolar Macrophages. *Viruses*. 2023 May 20;15(5):1207. doi: 10.3390/v15051207. PMID: 37243291; PMCID: PMC10222781.**

Contributions individuelles :

Yaima Burgher : Élaboration de tous les protocoles, acquisition, analyse et interprétation de tous les résultats, rédaction du manuscrit (brouillon initial et version finale).

Dr Chantale Provost : Conception des protocoles, optimisation de la préparation et du séquençage des bibliothèques, révision du manuscrit.

Marie-Jeanne Pesant : Optimisation de la préparation et du séquençage des bibliothèques, révision du manuscrit.

Dr Carl A. Gagnon : Conception du projet et des expériences, acquisition du financement, interprétation des résultats, révision du manuscrit.

Cet article a été inclus dans ce document de thèse avec quelques modifications concernant la mise en forme du journal *Viruses*, (<https://www.mdpi.com/journal/viruses>). Permission accordée

Article

Porcine Circovirus Modulates Swine Influenza Virus Replication in Pig Tracheal Epithelial Cells and Porcine Alveolar Macrophages

Yaima Burgher Pulgaron ¹, Chantale Provost ², Marie-Jeanne Pesant ¹ and Carl A. Gagnon ^{1,2,*}

¹ Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA-FRQ), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; yaima.burgher@umontreal.ca (Y.B.P.); marie-jeanne.pesant@umontreal.ca (M.-J.P.)

² Molecular Diagnostic Laboratory, Centre de Diagnostic Vétérinaire de l'Université de Montréal (CDVUM), Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; chantale.provost@insss.qc.ca

* Correspondence: carl.a.gagnon@umontreal.ca

Citation: Pulgaron, Y.B.; Provost, C.; Pesant, M.-J.; Gagnon, C.A. Porcine Circovirus Modulates Swine Influenza Virus Replication in Pig Tracheal Epithelial Cells and Porcine Alveolar Macrophages. *Viruses* **2023**, *15*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):

Received: 21 April 2023

Revised: 15 May 2023

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The pathogenesis of porcine circovirus type 2b (PCV2b) and swine influenza A virus (SwIV) during co-infection in swine respiratory cells is poorly understood. To elucidate the impact of PCV2b/SwIV co-infection, newborn porcine tracheal epithelial cells (NPTr) and immortalized porcine alveolar macrophages (iPAM 3D4/21) were co-infected with PCV2b and SwIV (H1N1 or H3N2 genotype). Viral replication, cell viability and cytokine mRNA expression were determined and compared between single-infected and co-infected cells. Finally, 3'mRNA sequencing was performed to identify the modulation of gene expression and cellular pathways in co-infected cells. It was found that PCV2b significantly decreased or improved SwIV replication in co-infected NPTr and iPAM 3D4/21 cells, respectively, compared to single-infected cells. Interestingly, PCV2b/SwIV co-infection synergistically up-regulated IFN expression in NPTr cells, whereas in iPAM 3D4/21 cells, PCV2b impaired the SwIV IFN induced response, both correlating with SwIV replication modulation. RNA-sequencing analyses revealed that the modulation of gene expression and enriched cellular pathways during PCV2b/SwIV H1N1 co-infection is regulated in a cell-type-dependent manner. This study revealed different outcomes of PCV2b/SwIV co-infection in porcine epithelial cells and macrophages and provides new insights on porcine viral co-infections pathogenesis.

Keywords: porcine circovirus; swine influenza A virus; epithelial cells; macrophages; co-infection; viral pathogenesis; virus replication

1. Introduction

The porcine respiratory disease complex (PRDC) causes enormous economic loss to the swine industry worldwide [1]. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine circovirus type 2 (PCV2) and swine influenza A virus (SwIV) are the main viruses associated with PRDC and are involved in costly outbreaks in swine production sites [2].

PCV2 is a non-enveloped single-stranded circular DNA virus that belongs to the *Circoviridae* viral family, genus *Circovirus* [3]. PCV2 is the etiological agent of several diseases and syndromes such as post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), among others which are collectively named porcine circovirus-associated disease (PCVAD) [4]. The prevalence of PCV2 infection is high in swine farms all over the world [5]. However, most PCV2 infections are reported to be subclinical [5]. It is noteworthy that the virus can alter the innate immune response and cause immunosuppression, which favors co-infection and/or secondary infection with other pathogens [6]. Eight genotypes of PCV2 have been described to date (PCV2a-PCV2h) [7-9]. The emergence of the PCV2b genotype in Canada was associated with a significant death rate increase during the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) outbreak in late 2004 [10] and was reported as the predominant genotype identified during the same period in samples submitted to the diagnostic service of the Faculty of Veterinary Medicine (Faculté de médecine vétérinaire) of the University of Montreal [10, 11].

Swine influenza A viruses (SwIV) are enveloped single-stranded negative sense RNA viruses belonging to the *Orthomyxoviridae* viral family, genus *Alphainfluenzavirus* [3]. The subtypes of influenza A virus (IAV) are determined by the hemagglutinin and neuraminidase proteins which are embedded into the envelope of the virion. Eighteen HA subtypes (H1–H18) and eleven NA subtypes (N1–N11) have been reported to date [12, 13]. SwIV subtypes H1N1, H1N2, H3N2, and A(H1N1)pdm09 have been the most frequently reported influenza A virus subtypes in swine worldwide [14]. In Canada, SwIV subtypes H1N1, H1N2 and H3N2 have been circulating in swine herds since at least the 1980s [15-21]. In 2009, A(H1N1)pdm09 was reported in swine in the Canadian provinces Manitoba, Alberta, Saskatchewan and Quebec [22]. Infections caused by SwIV are characterized by high morbidity and very low mortality [23]. It is known that IAV induces high levels of cytokine release very often associated with viral loads and severity of the disease [24].

PCV2 co-infections with SwIV or PRRSV have been extensively studied in vivo [25-33] and in vitro [34-37]. Even though PCV2 and SwIV co-infections are also prevalent in pigs [1], pathogenesis studies concerning this co-infection are scarce. Interestingly, an in vivo epidemiologic assessment showed that PCV2-positive pigs were more likely to be infected with SwIV than PCV2-negative pigs [38]. Other authors have reported that PCV2/SwIV H1N1 co-infection did not affect PCV2 replication in experimentally infected pigs, whereas PCV2 infection did increase SwIV-related clinical disease in the infected animals [39].

PCV mostly targets cells of monocyte/macrophage lineage in vivo but can infect other cell types [40, 41]. SwIV preferentially targets epithelial cells of the respiratory tract, but alveolar macrophages can also be infected [42-44]. Epithelial cells detect viral pathogens via pattern recognition receptors (PRRs) and release anti/proinflammatory cytokines to recruit and activate innate immune cells, which finally trigger innate and adaptive immune responses [45, 46]. On the other hand, the importance of macrophages for host defense against invading pathogens is well-known [47]. They are professional phagocytic cells that clear infectious particles and apoptotic cells and participate in the adaptive immune response by T cells activation via antigen presentation [47]. It is well-known that concomitant infections modulate viral pathogenesis and affect host immune cells' responses [1]. However, there is a lack of information regarding the effect of PCV2b/SwIV co-infections at the cellular and molecular level. The objective of the present study was to evaluate the effects of PCV2b/SwIV co-infections on virus-targeted host cells such as swine respiratory epithelial cells and porcine alveolar macrophages. The results of the present study revealed that PCV2b modulates SwIV replication during co-infection, meanwhile affecting SwIV mRNA cytokine expression and cellular genes modulation in infected cells, in a cell-type-dependent manner.

2. Materials and Methods

2.1. Cells

Newborn pig tracheal epithelial cell line (NPTr) and immortalized porcine alveolar macrophage (iPAM 3D4/21) cell line were used for all PCV2b and SwIV single and co-infections. Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) cell line was used for SwIV titration and propagation. The NPTr cell line was kindly provided by Dr. M. Ferrari (Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Brescia, Italy) [48]. The NPTr and the MDCK (ATCC CCL-34) cells were cultured in Eagle’s Minimum Essential Medium (EMEM) (Wisent Bioproducts, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Wisent Bioproducts, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada), 1 mM sodium pyruvate, 10 I.U./mL of penicillin, 10 µg/mL of streptomycin and 250 g/L amphotericin B solution (Wisent Bioproducts, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada) [48]. The iPAM 3D4/21 cell line (ATCC CRL-2843) was maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, Burlington, ON, Canada) with 10% FBS and adjusted to contain 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 10 mM HEPES (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate, 1 mM non-essential amino acids (Invitrogen) and 0.1 mg/mL streptomycin/100U penicillin solution (Invitrogen). All cells were cultivated in a humidified incubator in 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.

2.2. Viruses

The PCV2b strain (FMV-06-0732) was isolated from a clinical case in Quebec in 2006 (GenBank accession number: JQ994270) [10]. It was serially propagated in NPTr cells and then purified and concentrated following ultracentrifugation on a 30% sucrose cushion using the SW28 Beckman Coulter rotor (Beckman Coulter Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) at 25,000 rpm for 4 h.

The SwIV H1N1 (A/swine/St-Hyacinthe/148/1990) was isolated from pigs with respiratory symptoms during a 1990/91 outbreak of respiratory disease in Quebec (GenBank accession number: U11703) [16]. The SwIV H3N2 (A/swine/Quebec/1708732/2015(H3N2)) was isolated from a pig with acute respiratory disease (GenBank accession number: KX571068, KX571087, KX571114, KX571138, KX571161, KX571164, KX571200, KX571217). The sample was submitted by a veterinarian practitioner to Diagnostic Veterinary Virology Laboratory (DVVL) of the University of Montreal in 2015 as part of routine swine flu diagnostic testing. Viral titers of PCV2b and SwIV stocks were determined in NPTr cells and MDCK, respectively, via the Spearman–Kärber

method [49, 50]. Viral titers were expressed in tissue culture infectious dose 50% per mL (TCID₅₀/mL).

2.3. Immunofluorescence Assay

Single infection and co-infection were confirmed using an immunofluorescence assay (IFA) as previously described [51]. Briefly, the cell medium was removed and infected cells were fixed with a mixture of acetone–methanol (50/50, v/v) and incubated for a 20 min period. Thereafter, fixed infected cells were washed three times with a PBS solution and then permeabilized with a solution containing 0.1% triton X-100 in PBS and incubated for 10 min. After incubation with a blocking solution (1% bovine serum in PBS-Tween for 20 min), cells were incubated with a 1/200 dilution of the polyclonal PCV2 porcine antiserum [51] at 37 °C for 90 min and/or with 1/200 diluted monoclonal mouse anti-NP SwIV primary antibody (Bio-Rad). Then, the cells were washed three times with a solution containing 1% bovine serum in PBS-T and incubated with a 1/75 dilution of a goat anti-swine rhodamine conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) and/or a 1/200 dilution of goat anti-mouse FITC conjugated secondary antibody (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, Burlington, ON, Canada), at 37 °C for 60 min. After three washing steps, the cells were visualized using a Leica DMI 4000 inverted widefield fluorescence microscope (Leica Microsystems Inc., Richmond Hill, ON, Canada). Pictures were acquired with a DFC 490 digital camera (Leica Microsystems Inc.) and images were analyzed using Leica Application Suite Software, version 2.4.0 (Leica Microsystems Inc.) and ImageJ software (Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, LOCI, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA) [52]. Mock-infected cells were included in the immunofluorescence assay to verify the specificity of the antibodies (Supplemental Figure S1).

2.4. PCV2b/SwIV Co-Infection

To obtain PCV2b/SwIV co-infected cells, NPTr or iPAM 3D4/21 cells were firstly infected with PCV2b at an MOI of 0.05. Afterwards, PCV2b-infected cells were passaged at least three times in the presence of the virus to achieve a stable persistent infection. PCV2b-infected cells were thereafter dispensed into 24-well plates (1×10^5 cells/well) and then co-infected with SwIV H1N1 or H3N2 subtypes at a MOI of 1 for 1 h in the presence of trypsin (1µg/mL). Cells were then washed three times with PBS. Fresh medium with 2 % FBS was added to the wells and the plates

were incubated in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C. After 4, 12, 24, 48 and 72 h SwIV following infection, the cells were subjected to 2–3 rounds of freeze–thaw cycles to release virus particles and cell debris, which were then removed via centrifugation at 8000 rpm at 4 °C for 15 min. The supernatant was kept at –80°C until virus titer determination. SwIV titers were determined via the Spearman–Kärber method [49, 50] in MDCK cells and expressed as tissue culture infectious dose 50% per mL (TCID₅₀/mL). PCV2b quantification was performed via qPCR assay as described by Gagnon et al. (2008), using the primers and probe presented in Supplemental Table S1 [11]. PCV2b concentrations were expressed as DNA copy amount per mL.

2.5. Cell Viability Assay

Cell viability assay was performed at 24 h PCV2b/SwIV post-infection with the Celltiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA), according to manufacturer's instruction. Briefly, 20 µL of the reagent were added to each well of the microplate, the cells were then incubated for 2 h at 37 °C and the absorbance was measured at 490 nm (Biotek® Synergy HT plaque reader, Winooski, VT, USA). The infected cells' viability percentages were calculated using the non-infected cells as control. The experiments were carried out in triplicate and repeated at least two times.

2.6. Cytokine mRNAs Expression in PCV2b- and/or SwIV-Infected Cells

The modulation of mRNAs expression of the following interleukins (ILs), IL-6, IL-8, IL-10 and interferons (IFNs), IFN- α , IFN- β and IFN- γ in co-infected cells versus single-infected cells was assessed via RT-qPCR. Total cellular RNA was extracted from infected and mock-infected NPTr or iPAM 3D4/21 cells and purified with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Total RNA concentration was measured with a Qubit fluorometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Then, 1 µg of total cellular RNA was reverse transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, CA), according to the manufacturer's protocol. After the reverse transcription reaction, the cDNA was used in qPCR reactions with PowerTrack SYBR Green Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) on a QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Quantification of differences between groups was carried out using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. β_2 -microglobulin (B2M), β -actin (ACTB) and peptidylprolyl isomerase A (PPIA) were used as normalizing genes to compensate

for potential differences in cDNA amounts. Mock-infected cells were used as a calibrator reference in the analysis. The primers used for the specific amplification of the targeted cDNA are described in Supplemental Table S1 [53, 54].

2.7. 3' mRNA-seq Library Preparation and Sequencing

Total RNA was purified for RNA-seq analysis from infected cells as described in the previous section. RNA concentration and quality were assessed using Agilent 2100 Bioanalyzer apparatus with the RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Only RNA samples with acceptable RNA integrity number (RIN > 7) were submitted to library preparation. The cDNA libraries were constructed using Lexogen's QuantSeq™ 3' mRNA-Seq Kit (Lexogen GmbH, Vienna, Austria) according to the manufacturer's recommendations. A total of 12 libraries, including 3 libraries from PCV2b-infected cells, 3 from SwIV H1N1-infected cells, 3 from PCV2b/SwIV H1N1-infected cells and 3 from mock-infected cells, were synthesized. Concentration and quality of the purified libraries were assessed using the Qubit fluorometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and an Agilent high-sensitivity DNA kit with a Bioanalyzer (Agilent, CA, USA), respectively. All libraries were sequenced with a MiSeq high-throughput apparatus (Illumina, San Diego, CA, USA) using v3 cartridges (150-cycles) according to the manufacturer's instructions.

2.8. Bioinformatic Analysis

Raw sequencing data were imported in FASTQ format into CLC Genomics Workbench (version 22.0.1, Qiagen, CA, USA). Reads were trimmed for quality and adaptors using the CLC Genomics Workbench software and trimmed reads were mapped to *Sus scrofa* rRNA 12S, 16S and 18S. After removing the rRNA mapped reads, the remaining unmapped reads were mapped to the reference genome ([Sscrofa11.1](#)). The mapped reads were then used for differential expression calculations. Differentially expressed genes (DEGs) with a false discovery rate (FDR) threshold <0.05 and a fold change >1.5 were selected and used for volcano plots and Venn diagram visualization in CLC Genomics workbench. Pathway enrichment analysis was performed with the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, 2021) [55, 56]. Additionally, the list of DEGs from the co-infected cells was analyzed with ClueGo application (version 2.5.5) available in Cytoscape (version 3.9.1) to identify protein–protein interaction networks and associated cellular

pathways [41–44]. All sequences were deposited in GEO repository (accession number GSE229215).

2.9. Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Prism 7.0.0). The different statistical tests used within each analysis are described in figure legends. Differences were considered significant at p -value < 0.05.

3. Results

3.1. Modulation of Swine Influenza A Virus Replication in Co-Infected PCV2b/SwIV H1N1 Cells

The immunofluorescence assay (IFA) performed on co-infected NPTr and iPAM 3D4/21 cells confirmed the simultaneous presence of PCV2b and SwIV H1N1 antigens in the cells (Figure 1). Similar results were observed in PCV2b/SwIV H3N2 co-infected cells. PCV2b internalized with similar efficiency in NPTr and iPAM 3D4/21 cells as the percentage of PCV2b-positive cells determined via IFA was similar for both types of cells. However, the number of SwIV H1N1-positive cells was significantly higher in infected NPTr cells than in infected iPAM 3D4/21 cells ($p < 0.001$).

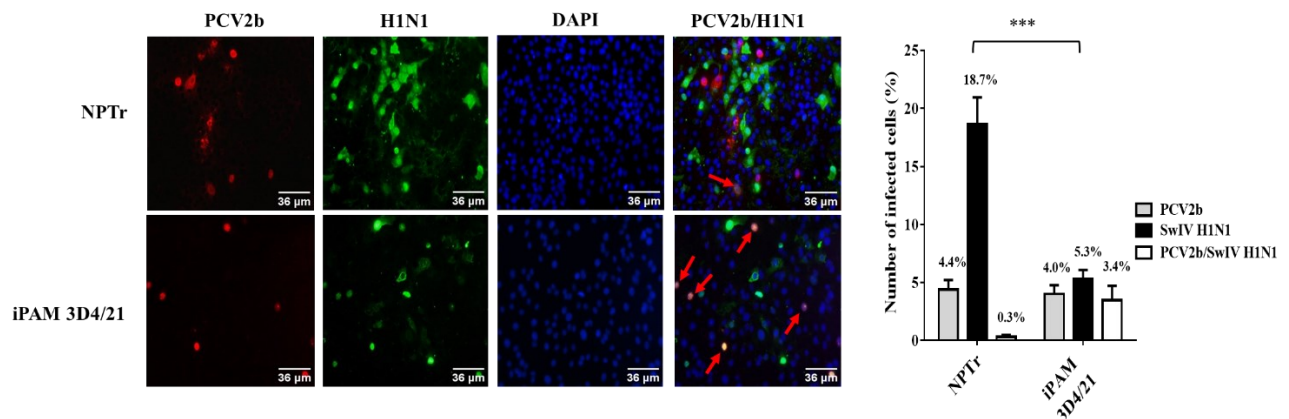


Figure 1. PCV2b and SwIV H1N1 co-localization in both NPTr and iPAM 3D4/21 co-infected cells. IFA was performed at 24 h post-infection to detect PCV2b (red) and SwIV H1N1 (green) in co-infected cells. The cells were infected with 0.05 MOI of PCV2b and passaged 2–3 times. Then, PCV2b-infected cells were infected with 1 MOI of SwIV H1N1. Nuclear staining with DAPI is shown in blue. Co-localization pictures were realized with ImageJ. The red arrows point to single cells expressing both PCV2b and SwIV H1N1

antigens. Statistical analyses were carried out using a two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test (GraphPad Prism software, version 7.00). *** $p < 0.001$

The infectious titer of SwIV H1N1/H3N2 subtypes and the PCV2b viral genome quantity in co-infected cells was determined and compared to single-infected cells at different times post-infection (Figure 2). The SwIV H1N1 and H3N2 infectious titer at 24 h post-infection (hpi) was significantly higher ($p < 0.0001$) in single-infected NPT_r cells compared to single-infected iPAM 3D4/21 cells. These results were expected considering that SwIV preferentially infects epithelial cells of the respiratory tract [42]. However, PCV2b qPCR quantification results were similar in both infected NPT_r and infected iPAM 3D4/21 cells (Figure 3), confirming the IFA results (Figure 1).

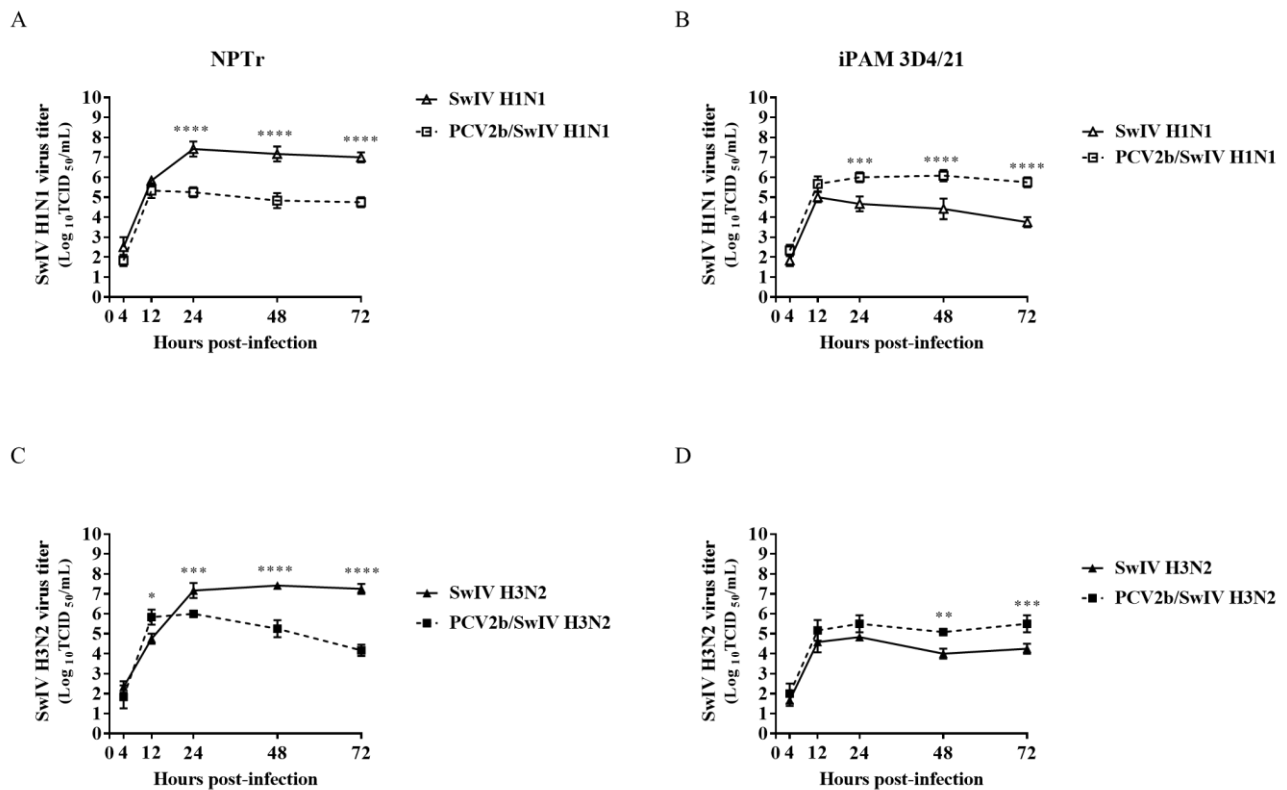


Figure 2. PCV2b co-infection effects on SwIV replication in infected NPT_r and iPAM 3D4/21 cells. The SwIV titer was determined in MDCK cells using the Spearman–Kärber method and expressed in tissue culture infectious dose 50% per mL (TCID₅₀/mL). The PCV2b/SwIV H1N1 (A) and PCV2b/SwIV H3N2 (C) co-infection experiment in NPT_r cells, and PCV2b/SwIV H1N1 (B) and PCV2b/SwIV H3N2 (D) co-infection experiment in iPAM 3D4/21 cells were repeated 3 times. Data are presented with standard deviation (SD)

values. Statistical analyses were carried out using two-way repeated-measures ANOVA (GraphPad Prism software, version 7.00). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

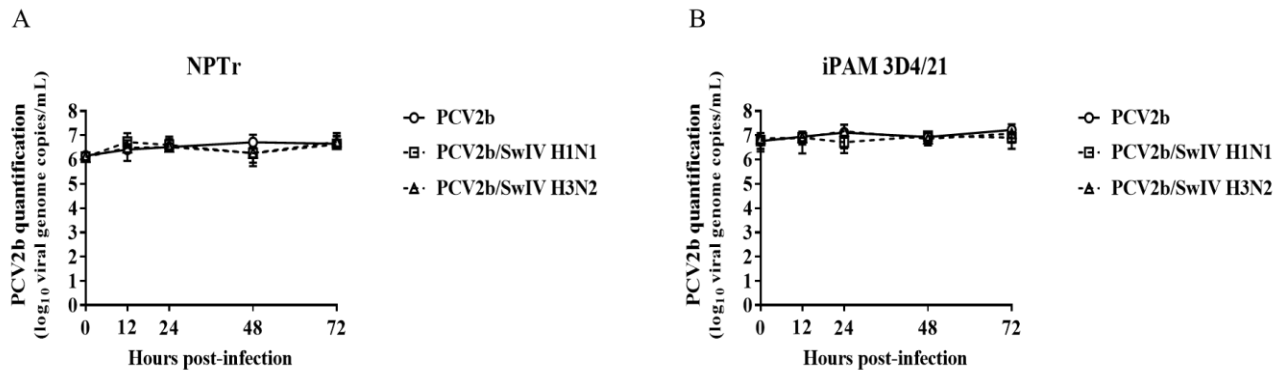


Figure 3. SwIV co-infection effects on PCV2b replication in infected NPTTr and iPAM 3D4/21 cells. PCV2b quantification in co-infected NPTTr (A) and iPAM 3D4/21 (B) cells was performed using qPCR assay and expressed as PCV2b genome copies per mL of sample. The experiments were repeated 3 times. Mock-infected cells were PCV2 qPCR-negative (with Ct > 36) and the results are not illustrated in the figure. Data are presented with standard deviation (SD) values. Statistical analyses were carried out using two-way repeated-measures ANOVA (GraphPad Prism software, version 7.0.0).

During co-infection, it was found that PCV2b modulated the replication kinetics of both subtypes of SwIV, H1N1 and H3N2, in the infected cells. In fact, the SwIV infectious titer decreased significantly after 24 hpi in PCV2b/SwIV co-infected NPTTr cells compared to cells infected only with SwIV (Figure 2A,C). Inversely, in infected iPAM 3D4/21 cells the infectious titers of SwIV H1N1 and H3N2 were significantly higher in co-infected cells versus single-infected cells (Figure 2B,D). However, the presence of SwIV did not seem to influence the PCV2b replication during co-infection. (Figure 3).

3.2. Cell Viability Assay

To evaluate whether the modulation of SwIV replication during co-infection could affect cell viability compared to single infection, a cell viability assay was performed at different times post-infection in single-infected and co-infected NPTTr and iPAM 3D4/21 cells. As expected, the cell viability decreased from 24 hpi to 72 hpi in co-infected as well as in single-infected cells compared to mock-infected cells (Figure 4). Moreover, the dual infection of PCV2b and SwIV in both NPTTr and iPAM 3D4/21 cells significantly decreased the cell viability over time compared to SwIV single-

infected cells. Nevertheless, no significant differences were found between PCV2b co-infected and single-infected cells.

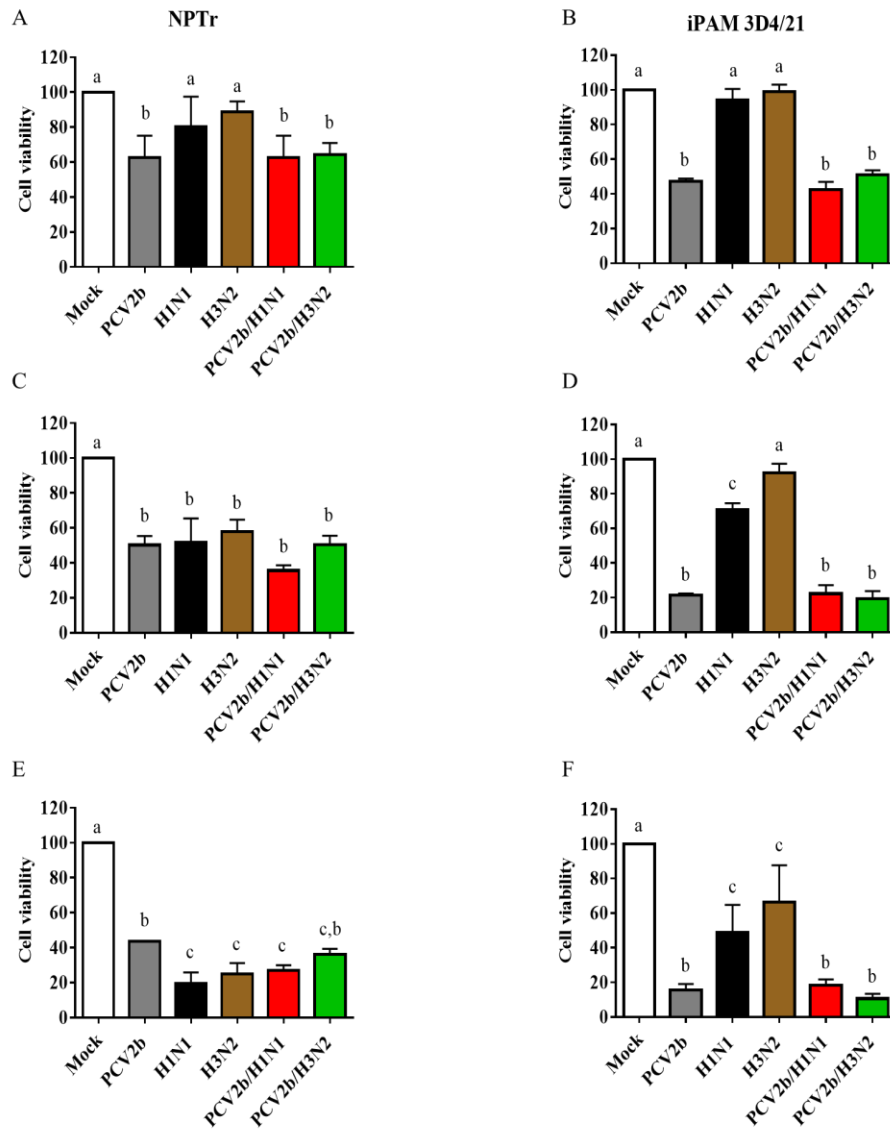


Figure 4. Cell viability assay. Cell viability was determined in single-infected and co-infected PCV2b/SwIV cells at 24 hpi (A, B), 48 hpi (C, D) and 72 hpi (E, F) in NPTr (A, C, E) and iPAM 3D4/21 cells (B, D, F). The experiments were repeated three times. The data represent percentage of cell viability in infected cells with respect to mock-infected cells and are presented with standard deviation (SD) values. Statistical analyses were carried out using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (GraphPad Prism software, version 7.0.0). Different superscripts indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$) between groups.

3.3. Modulation of Cytokines' mRNAs Expression in Co-Infected Cells

The levels of mRNA expression of pro-inflammatory (IL-6 and IL-8) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines, as well as of type I IFN (IFN- α/β) and type II IFN (IFN- γ), were measured at 24 h post-infection in single-infected and co-infected cells. The results obtained with infected NPTr cells revealed that IL-6, IL-8, and IL-10 mRNA expressions were higher in PCV2b/SwIV H1N1 and PCV2b/SwIV H3N2 co-infected cells compared to SwIV H1N1 and SwIV H3N2 single-infected cells, respectively (Figure 5A). However, no difference was found for mRNA expression of interleukins tested between PCV2b/SwIV H1N1- and PCV2b-infected cells. In PCV2b/SwIV H3N2-infected NPTr cells, IL-6 and IL-10, but not IL-8, mRNA expression was reduced compared to PCV2b single-infected cells (Figure 5A).

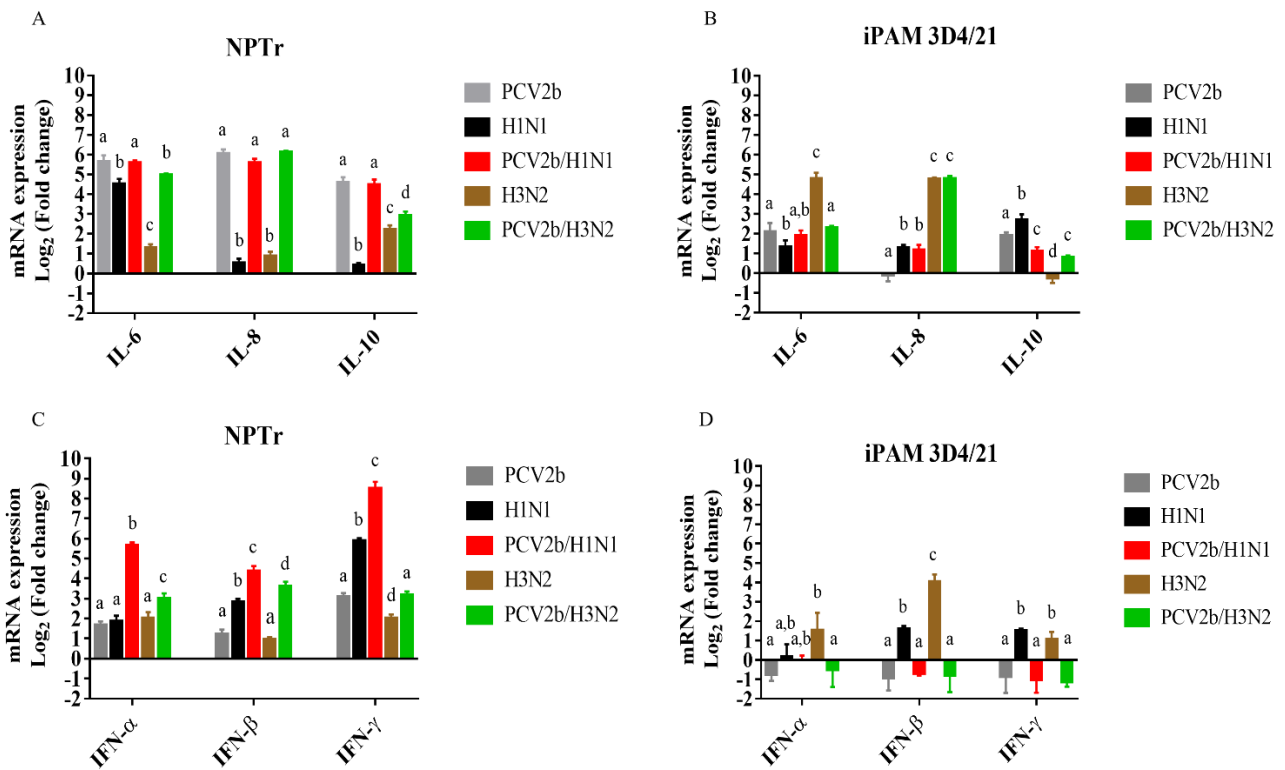


Figure 5. PCV2b/SwIV co-infection effects on the modulation of cytokines' mRNA expression. The mRNA expressions of IL-6, IL-8 and IL-10 in NPTr cells (A) and iPAM 3D4/21 (B) as well as of IFN- α , IFN- β and IFN- γ in NPTr cells (C) and iPAM 3D4/21 (D) were determined using RT-qPCR assays. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to calculate the fold change of cytokine mRNA expression in infected cells with respect to mock-infected cells at 24 h post-infection. The experiments were repeated at least three times. All data are presented with standard deviation (SD) values. Statistical analyses were carried out using an ordinary two-

way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (GraphPad Prism software, version 7.0.0). Different superscripts indicate a statistically significant difference ($p < 0.01$) between groups within the same tested cytokine mRNA.

As shown in Figure 5B, in iPAM 3D4/21 cells, the co-infection with PCV2b and SwIV H1N1 did not significantly impact the IL-6 mRNA expression. However, in co-infected PCV2b/SwIV H3N2 cells, IL-6 expression was reduced compared to SwIV H3N2-infected cells, but not when comparing to PCV2b single-infected cells. IL-10 expression decreased in PCV2b/SwIV H1N1 co-infected iPAM 3D4/21 cells compared to PCV2b- or SwIV H1N1-infected cells. The dual infection of PCV2b and SwIV H3N2 increased the expression of IL-10 regarding to SwIV H3N2 alone, however, the transcriptional level of this cytokine was significantly reduced in these infections compared to PCV2b single-infected cells.

In the case of IFN type I response, a clear synergistic effect was observed in co-infected NPT_r cells as IFN- α and IFN- β mRNAs expression was significantly higher in co-infected cells compared to in PCV2b or SwIV (H1N1 or H3N2) single-infected cells (Figure 5C). Similar results were obtained for IFN- γ in PCV2b/SwIV H1N1 co-infected cells compared to single-infected cells. However, although significant differences were observed in the mRNA expression of IFN- γ between PCV2b/SwIV H3N2 and SwIV H3N2 infections, no difference was found when compared to PCV2b single-infected cells (Figure 5C).

Regarding the IFN response in co-infected iPAM 3D4/21 cells (Figure 5D), no difference was observed on the mRNA expression of the IFNs tested compared to PCV2b-infected cells. Nevertheless, IFN- β and IFN- γ mRNA expressions were significantly higher in SwIV (H1N1 or H3N2) single-infected cells compared to PCV2b/SwIV co-infected cells. Additionally, IFN- α mRNA expression was higher in SwIV H3N2-infected than in co-infected cells. It is interesting to note that the cell type influenced the modulation of IFN mRNA expression. For example, the mRNA expression levels of IFN- α , IFN- β and IFN- γ were up-regulated in NPT_r cells following PCV2b infection (Figure 5C) compared to mock-infected cells; however, in PCV2b-infected iPAM 3D4/21, there was a trend toward down-regulation of those mRNAs (Figure 5D). This difference in IFNs' transcriptional response was also observed between co-infected NPT_r and iPAM 3D4/21 cells (Figure 5C,D). Overall, these results at least revealed that dual PCV2b and SwIV infection modulates cytokine transcriptional responses in a cell-type-dependent manner.

3.4. Differentially Expressed Genes (DEGs) and Pathway Enrichment Analysis in PCV2b-, SwIV H1N1- and PCV2b/SwIV H1N1-Infected Cells

RNA-seq analysis was performed to characterize and compare the transcriptomic response in NPTr and iPAM 3D4/21 co-infected and single-infected cells. The transcriptomic analyses were performed at 24 hpi to ensure there was a significant amount of suitable viable cells following viral infection. SwIV H1N1 was chosen for the present experiment because during SwIV H1N1/PCV2b co-infection, the modulation of SwIV replication was greater at 24 hpi compared to that with SwIV H3N2/PCV2b co-infection (Figure 2).

First, 3' mRNA sequencing was used to identify the DEGs in infected cells compared to mock-infected cells. In the NPTr cells, 365, 98 and 627 DEGs were identified in PCV2b-, SwIV H1N1- and PCV2b/SwIV H1N1-infected cells, respectively, when compared to mock-infected cells. (Figure 6A). The number of up-regulated and down-regulated genes in each infection is listed in Supplemental table S2 and S3. In iPAM 3D4/21 cells, 316, 64 and 164 DEGs were identified in PCV2b-, SwIV H1N1- and PCV2b/SwIV H1N1-infected cells, respectively, compared to mock-infected cells. (Figure 6B). The number of up-regulated and down-regulated genes in each infection is shown in Supplemental Tables S4 and S5.

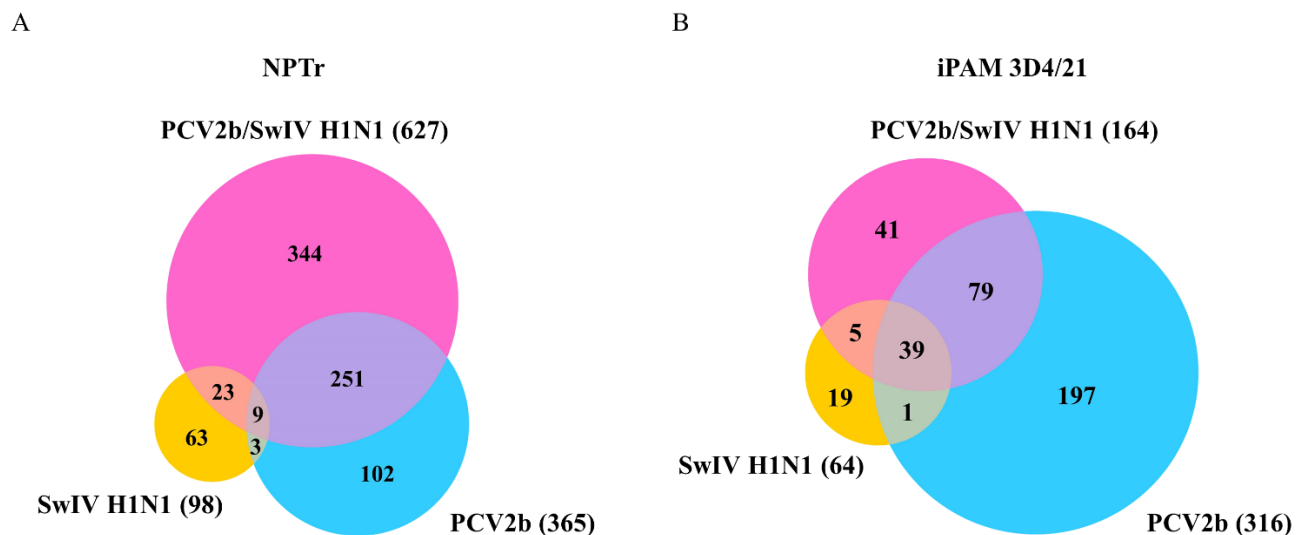


Figure 6. Venn diagram of differentially expressed genes (DEGs) in PCV2b/SwIV co-infected cells. Mock-infected cells were used as control to identify DEGs in NPTr (A) and iPAM 3D4/21 (B) single-infected and co-infected cells. The numbers in overlapping areas represent the number of DEGs shared among the

different virus infection experimental groups. A false discovery rate (FDR) < 0.05 and a fold change cut-off of 1.5 was used to identify the DEGs.

The identified DEGs were used to perform pathway enrichment analysis to determine the cellular pathways impacted during viral infection in single- and co-infected cells. After the enrichment analysis, the top 10 over-represented pathways with an FDR < 0.05 were retained. Only pathways with a fold enrichment > 2 are illustrated in infected NPTr cells (Figure 6). In the case of iPAM 3D4/21 cells, the number of enriched pathways with the same FDR \geq 2 was extremely high. That is why only pathways with a fold enrichment > 4 are depicted in iPAM 3D4/21 cells.

The pathway enrichment analysis in NPTr cells revealed the following cellular pathways: ECM–receptor interaction, protein processing in endoplasmic reticulum, focal adhesion and regulation of actin cytoskeleton; these were among the most enriched pathways in PCV2b-infected cells as well as in co-infected cells (Figure 7A,C). Other over-represented pathways in NPTr co-infected cells included mRNA surveillance, HIF-1 signaling pathway, spliceosome, phagosome, NOD-like receptor signaling pathway and influenza A pathway (Figure 7E). In SwIV H1N1-infected NPTr cells, the most enriched pathways were related to the protein synthesis machinery and included the following pathways: translation, ribosome, metabolism of proteins, among others involved in similar functions (Figure 7C). Additionally, nonsense-mediated decay (NMD) pathways were identified in SwIV H1N1-infected NPTr cells. The pathway enrichment analysis performed with iPAM 3D4/21 cells showed that in single-infected as well as in co-infected cells, NF-Kappa B and TNF signaling pathways were the most enriched pathways in the set of DEGs analyzed. However, in co-infected cells, additional enriched cellular pathways were found; these included apoptosis, influenza A, HIF-1 signaling pathway and MAPK signaling pathways (Figure 7B,D,E,F).

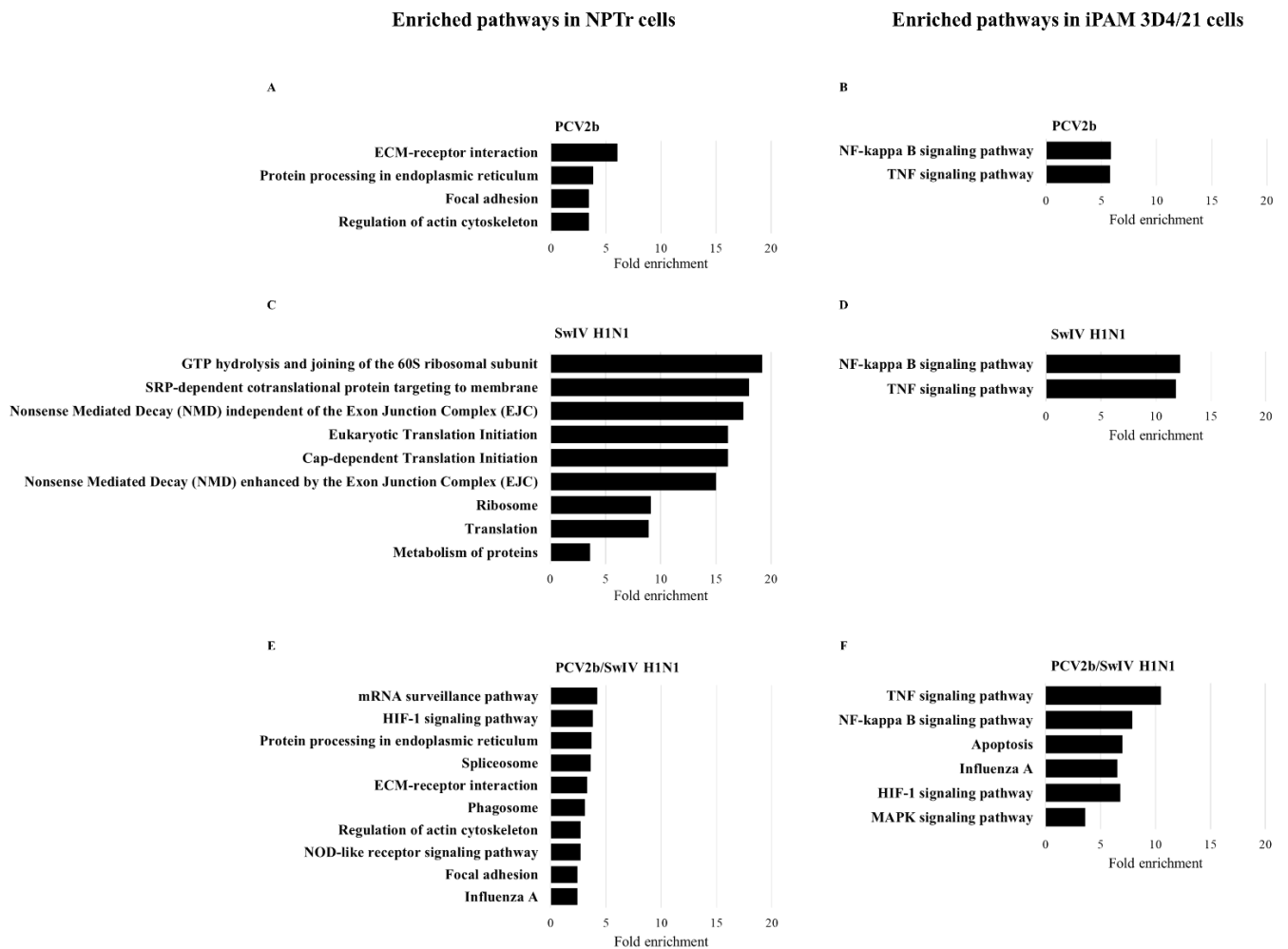


Figure 7. KEGG pathway enrichment analysis of the DEGs identified in single-infected and co-infected cells. Enriched KEGG pathways after PCV2b, SwIV H1N1 and PCV2b/SwIV H1N1 infection in NPTr cells (A, C, E, respectively) and in iPAM 3D4/21 cells (B, D, F, respectively) are illustrated. The FDR value < 0.05 was considered for statistically significant enriched pathways.

An additional analysis was performed using the Cytoscape’s ClueGo application with the list of DEGs from the co-infected cells to identify protein–protein interaction networks and to confirm the cellular pathways modulated during PCV2b/SwIV H1N1 co-infection. This analysis confirmed the enrichment of cellular pathways such as mRNA surveillance, spliceosome, protein processing in endoplasmic reticulum, phagosome and regulation of actin cytoskeleton in NPTr co-infected cells (Supplemental Figure S2). In co-infected iPAM 3D4/21 cells, HIF-1 signaling pathway, TNF signaling, regulation of innate immune response, IL-17 signaling, adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains, apoptosis and influenza A pathways were identified (Supplemental Figure S3). The

Supplemental Figures S2 and S3 illustrate several DEGs that are involved in more than one cellular pathway in co-infected NPTr and iPAM 3D4/21 cells, respectively.

4. Discussion

In the present study, PCV2b replication was not modulated in the presence of both SwIV strains (H1N1 or H3N2) nor in both infected cell lines being tested (Figure 3). These results are in accordance with those of previous studies. For example, Wei et al. (2010) concluded that infection of caesarean-derived colostrum-deprived pigs with SIV H1N1, one week after a previous infection with PCV2, did not influence PCV2 replication in dually infected pigs, while PCV2 infection increases SwIV-related clinical disease [39]. Unfortunately, this previous study did not provide any information regarding the effect of PCV2/SwIV co-infection on SwIV replication. Interestingly, our results demonstrated that PCV2b modulated SwIV replication in a cell-type-dependent manner (Figure 2). In fact, PCV2b decreased the replication of SwIV in NPTr cells, whereas the SwIV titer was enhanced in iPAM 3D4/21 co-infected cells. Productive replication of SwIV in macrophages can alter antiviral macrophage functions such as phagocytosis, resulting in enhanced disease severity and impaired bacterial clearance during secondary bacterial infection [47, 57].

It is noteworthy that at 24 hpi, both PCV2b/SwIV co-infected NPTr and iPAM 3D4/21 cells had a significant decrease in cell viability compared to SwIV single-infected cells. Previous studies have reported that a decreased cell viability significantly reduces the production of infectious viruses from pig respiratory epithelial cells [58]. This would explain why SwIV replication was significantly reduced in PCV2b/SwIV co-infected NPTr cells in the present study. However, in co-infected iPAM 3D4/21 cells, the SwIV replication was rather enhanced, even when the cell viability was decreasing over time in dual-infected cells compared to SwIV single-infected cells. Previous studies revealed that PCV2b infection in PAMs activates NF- κ B, phospho-Akt and MAPK signaling pathways in infected cells. The activation of these signaling pathways can be detected in the first 30 min after PCV2 infection [59]. It is known that influenza virus replication starts early after virus entry in the cells. Viral mRNA starts to accumulate within the first hour post-infection and viral genome replication starts 1.5 to 2 hpi [60]. The modulation of cytokines and the activation of NF- κ B and MAPK signaling pathways, among others, have been shown to be important for a successful influenza virus infection [61]. It is possible that the modulation of cytokines' expression and the activation of signaling pathways in iPAM 3D4/21 cells in the first 24 h after PCV2b infection

could lead to an enhanced SwIV replication in co-infected cells in the present study, even when the cell viability decreased throughout the viral infection.

PCV2b has been previously reported to induce up-regulation of cytokines such as IL-6, IL-8 and IL-10 in vitro [59, 62, 63]. In the present study, IL-6 and IL-10 mRNA expressions were increased via PCV2b infection in NPTr and iPAM 3D4/21 cells in accordance with previous studies reporting up-regulation of IL-6 in epithelial cells [63] and increased levels of IL-6 and IL-10 in porcine alveolar macrophages (PAMs) [64, 65]. In the present study, IL-8 mRNA was upregulated in PCV2b-infected NPTr cells, as expected, whereas it was not in PCV2b-infected iPAM 3D4/21 cells (Figure 5). These results do not correlate with those of previous reports showing a significant up-regulation of IL-8 mRNA expression and/or protein production in PCV2-inoculated swine alveolar macrophages [66, 67]. The contradictory results obtained in the present study may be due to the time points selected to measure the expression of this cytokine in macrophages after PCV2b infection or the use of an immortalized PAM cell line (3D4/21) instead of primary porcine alveolar macrophages. It is noteworthy that cytokine mRNA expression was determined in persistently PCV2b-infected cells to mimic the superinfection events that occurs in PCV2b previously infected pigs. Therefore, a persistent PCV2b infection in iPAM 3D4/21 cells could have a differential effect on mRNA expression compared to an acute PCV2b cell infection.

Induction of pro-inflammatory cytokines during SwIV infection has been correlated with viral replication and clinical signs [68]. In the current study, IL-6, IL-8, and IL-10 mRNA expressions were higher in PCV2b/SwIV (H1N1 or H3N2) co-infected NPTr cells compared to SwIV H1N1 and SwIV H3N2 single-infected cells. However, no difference was observed regarding the tested interleukin mRNA expression levels between PCV2b/SwIV H1N1- and PCV2b-infected cells. Nevertheless, in PCV2b/SwIV H3N2-infected cells, IL-6 and especially IL-10 mRNA expression levels were significantly reduced compared to PCV2b single-infected NPTr cells (Figure 5A). These results reveal that the modulation of interleukin expression via PCV2b/SwIV co-infection on NPTr cells might be influenced by the SwIV genotype being investigated.

Regarding the mRNA expression of antiviral cytokines such as IFNs, their expression level modulations in co-infected cells were found to be cell-type-dependent. In NPTr cells, the IFN type I (α/β) mRNA expression levels were synergistically up-regulated in co-infected cells compared to single-infected cells, whereas in iPAM 3D4/21 cells, a trend towards a reduced IFN type I and II

mRNA expression was observed in PCV2b single-infected and co-infected cells (Figure 5). Several researchers have previously reported contradictory data in regard to the modulation of IFN response following infection with PCV2b. Wang et al. (2022) reported that PCV2 infection interferes with the activation of type I IFNs signaling pathway and inhibits the IFN-induced ISGs expression *in vivo* and *in vitro* [69]. Others have reported the inhibition of IFN- α in porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [70, 71] and the inhibition of type I IFN (IFN- α /IFN- β) in PK-15 cells [72, 73] following PCV2 infection or in the presence of PCV2 viral protein or DNA. In addition, according to Gao et al. (2014), PCV2 significantly inhibited pseudorabies virus (PRV)-induced IFN- γ mRNA expression in swine PBMC *in vitro* [74]. However, other authors have reported that porcine circovirus type 2 induces type I interferon production in porcine alveolar macrophages [75] and IFN- β in PK-15-infected cells [76]. Interestingly, it is known that the PCV2 genome contains CpG motifs with both IFN- α inhibitory and stimulatory properties [77]. Kekarainen et al. (2008b) suggested that PCV2 viral elements can distinctly regulate cytokine production according to the cell population [78]. Overall, it is easy to conclude that IFN response modulation following PCV2 infection is complex and could vary depending on the experimental models being studied (in the present study: tracheal epithelial cells versus macrophages).

It is known that type I and III IFNs are rapidly induced after influenza virus sensing via pattern recognition receptors (Toll-like receptors, RIG-I-like receptors, NOD-like receptors) on respiratory epithelial cells. The released IFNs bind to their cognate receptors and activate the JAK-STAT signaling pathway. This triggers the transcription of hundreds of IFN-stimulatory genes (ISGs) that induce an “antiviral state” in infected and nearby cells to ultimately restrict viral replication and propagation [79-83]. In a study performed by Wu et al. (2022), the authors overexpressed microRNA let-7 in A549 cells, which resulted in an increase of interferon type I mRNA expression and consequently inhibited influenza virus infection [84]. Moreover, Fong et al. (2022) demonstrated that IFN- γ inhibits influenza virus replication in respiratory epithelial cells by reducing viral binding onto the cells [85]. The results obtained during the present study suggest that the increased expression of IFN mRNA in PCV2b/SwIV-infected NPTr cells could lead to a reduction in SwIV viral replication compared to single SwIV-infected cells. It is also well-known that the influenza virus possesses several strategies to counteract IFN response [86, 87]. That would explain why the increased IFN mRNA expression in co-infected NPTr cells could be

responsible for a partial reduction in, and not a complete shutdown of, SwIV replication (Figure 2). Interestingly, Czerkies et al. (2022) have reported interference between respiratory syncytial virus (RSV) and influenza A virus H1N1 in human alveolar epithelial cells (A549). The authors of the report found that previous infection of cells with RSV does not prevent a subsequent influenza virus infection, whereas RSV indeed protects bystander cells against influenza virus infection by triggering secretion of type I and type III IFNs [88]. A similar effect in PCV2b/SwIV co-infected NPTr cells could be involved and explain the PCV2b impact on the apparent inhibition of SwIV replication. However, this PCV2b bystander phenomenon effect on SwIV replication is highly plausible, though it still needs to be demonstrated. In iPAM 3D4/21 co-infected cells, PCV2b completely impaired the modulation of the transcriptional expression of IFN- β and IFN- γ by SwIV. Gao et al. (2014) have reported a similar PCV2 effect on IFN expression during dual infection with pseudorabies virus (PRV) in PBMC [74]. In this previous study, PCV2 significantly inhibited the ability of inactivated PRV to induce IFN- γ expression. The authors suggested that PCV2 could affect the cell immune response to PRV [74]. In the context of the present study, it is believed that the impaired IFN response observed in PCV2b persistently infected iPAM 3D4/21 cells could favor SwIV infection and replication. It is important to point out that although a modulation of the expression of IFNs' mRNA was revealed in the infected cells, these results require confirmation using other methods, such as ELISA.

Differential transcriptome analysis of PCV2b/SwIV H1N1 and single-infected porcine cells revealed distinct signatures on host gene expression that may have impacted SwIV H1N1 replication during the co-infection. Several of the most enriched pathways identified in co-infected cells in this study are known to be involved in the host antiviral response and influenza virus pathogenesis and propagation [61] such as NOD-like receptor signaling pathway in co-infected NPTr cells and apoptosis and MAPK signaling pathways in co-infected iPAM 3D4/21 cells (Figure 7). NOD-like receptors (NLR) are a specific family of cytosolic pattern-recognition receptors (PRRs) that contains more than 20 members in mammals and plays a pivotal role in the recognition of intracellular ligands [89]. A group of NLRs are associated with the formation of the inflammasome, a cytosolic multiprotein complex that, once activated, induces the production of IL-1 β and IL-18 and the recruitment of immune cells to the site of infection [90, 91]. The NLRP3 inflammasome has an important role in the immune response against influenza A virus infection. Its role in both

protective and detrimental immune responses during influenza A virus infection has been studied and extensively reviewed [91-94]. Interestingly, NLRP3 was found to be up-regulated in PCV2b/SwIV H1N1-infected NPTr cells (FC 6.16, FDR = 0.04) but not in SwIV H1N1 and PCV2b single-infected cells. Moreover, DDX3X, a host protein which has been implicated in the coordination of host defense against influenza virus by activating the NLRP3 inflammasome and type I interferon response [95, 96] was upregulated in co-infected NPTr cells (FC 3, FDR = 5.84×10^{-4}) and in PCV2b-infected cells (FC 2.42, FDR = 0.01), but not in SwIV H1N1-infected cells.

Apoptosis and MAPK pathways can be modulated during the replication cycle of the influenza virus to favor viral infection. Wurzer et al. (2003) have found that caspase 3 activation during the onset of apoptosis is important for efficient influenza virus propagation [97]. The MAPK pathway, on the other hand, has been shown to positively regulate multiple steps of influenza virus replication such as RNA synthesis, vRNP export and release (budding) of virus, clathrin-independent endocytosis and viral internalization, nuclear export and protein synthesis, (see the review of Kumar et al. 2018 [98] for information and references regarding the role of MAPK signaling in the replication of several virus, including influenza virus).

HIF-1 signaling pathway was identified among the most modulated pathways in the co-infected NPTr and iPAM 3D4/21 cells but not in PCV2b or SwIV H1N1 single-infected cells (Figure 7). HIF-1-related pathways have been reported to be involved in viral infections and in the innate and the adaptive immune responses of the host against viruses [99]. Previous reports regarding HIF-1's role in influenza virus pathogenesis are contradictory. It was reported that the H1N1 virus activates HIF-1 pathway and then induces glycolysis to promote viral replication, whereas knockdown of this pathway significantly reduced H1N1 replication in A549 cells [100]. However, in another study, it was demonstrated that HIF-1 α knockdown in A549 cells promoted influenza A virus replication by promoting autophagy in cells [101].

5. Conclusions

In conclusion, it was found that PCV2b decreases SwIV replication in porcine tracheal epithelial cells while enhancing SwIV replication in alveolar porcine macrophages, probably through modulation of IFN expression. In addition, PCV2b and SwIV were found to synergistically enhance IFNs mRNA expression in infected NPT_r cells, whereas in iPAM 3D4/21 cells, PCV2b impaired the capacity of SwIV to promote IFNs mRNA expression. Cellular genes and pathways were found to be differentially modulated in PCV2b/SwIV H1N1 co-infected cells compared to PCV2b and SwIV H1N1 single-infected cells. However, further studies are needed to establish the role of identified DEGs and cellular pathways in the pathogenesis of PCV2b/SwIV co-infection.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Immunofluorescence assay performed on NPT_r and iPAM 3D4/21 mock-infected cells; Figure S2: Protein–protein interaction networks and associated cellular pathways on PCV2b/swH1N1 co-infected NPT_r cells; Figure S3: Protein–protein interaction networks and associated cellular pathways on PCV2b/swH1N1 co-infected iPAM 3D4/21 cells; Table S1: List of primers and probe used for PCV2b quantification and primers used in RT-qPCR for cytokines mRNA quantification in NPT_r and iPAM 3D4/21 cells; Table S2: Up-regulated genes in NPT_r cells; Table S3: Down-regulated genes in NPT_r cells; Table S4: Up-regulated genes in iPAM 3D4/21 cells; Table S5: Down-regulated genes in iPAM 3D4/21 cells.

Author Contributions: Y.B.P.: Development of all the protocols, acquisition, analysis and interpretation of all the results, writing original draft and revision of the manuscript. C.P.: Project and protocols design, optimization of the library preparation and sequencing, revision of the manuscript. M.-J.P.: Optimization of the library preparation and sequencing, revision of the manuscript. C.A.G.: Design of the project and the experiments, funding acquisition, interpretation of the results, revision of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was funded by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) discovery grant (number RGPIN-2017-05240). C.A. Gagnon is financially supported by a Canadian Swine Research and Development Cluster (CSRDC) research project, Les Éleveurs de porcs du Québec and by Probiotech International (number 1781). Y. Burgher was a

recipient of a graduate student scholarship from the Fonds de recherche du Québec–Nature et technologie (FRQNT). Y. Burgher and M.J. Pesant were also recipients of graduate student scholarships from the Swine and poultry infectious diseases research center (Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole, CRIPA-FRQ) and of different graduate student merit scholarships for Graduate and Postdoctoral Studies from the Université de Montréal.

Institutional Review Board Statement: Not applicable

Informed Consent Statement: Not applicable

Data Availability Statement: The data presented in this study are openly available in Preprints.org at DOI: 10.20944/preprints202304.0781.v1, reference number preprints-71630

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge the support of current and former post-graduate students of Dr Gagnon’s Laboratories, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

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

References

1. Opriessnig, T., Gimenez-Lirola, L.G., and Halbur, P.G., *Polymicrobial respiratory disease in pigs*. Anim Health Res Rev, 2011. **12**(2): p. 133-48.
2. Brockmeier, S.L., Halbur, P.G., and Thacker, E.L., *Porcine respiratory disease complex*. Wiley Online Library. Hoboken, NJ, USA, 2002: p. 231-258.
3. Lefkowitz, E.J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G., and Smith, D.B., *Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Nucleic acids research, 2018. **46**(D1): p. D708-D717.
4. Chae, C., *A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases*. Vet J, 2005. **169**(3): p. 326-36.
5. Segales, J., *Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis*. Virus Res, 2012. **164**(1-2): p. 10-9.
6. Shi, R., Hou, L., and Liu, J., *Host immune response to infection with porcine circoviruses*. Animal Diseases, 2021. **1**: p. 1-10.
7. Franzo, G. and Segales, J., *Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology*. PLoS One, 2018. **13**(12): p. e0208585.
8. Wang, Y., Noll, L., Lu, N., Porter, E., Stoy, C., Zheng, W., Liu, X., Peddireddi, L., Niederwerder, M., and Bai, J., *Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016-2018*. Transbound Emerg Dis, 2020. **67**(3): p. 1284-1294.
9. Link, E.K., Eddicks, M., Nan, L., Ritzmann, M., Sutter, G., and Fux, R., *Discriminating the eight genotypes of the porcine circovirus type 2 with TaqMan-based real-time PCR*. Virol J, 2021. **18**(1): p. 70.
10. Gagnon, C.A., Tremblay, D., Tijssen, P., Venne, M.H., Houde, A., and Elahi, S.M., *The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada*. Can Vet J, 2007. **48**(8): p. 811-9.
11. Gagnon, C.A., del Castillo, J.R., Music, N., Fontaine, G., Harel, J., and Tremblay, D., *Development and use of a multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction*

- assay for detection and differentiation of Porcine circovirus-2 genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey. J Vet Diagn Invest, 2008. 20(5): p. 545-58.*
12. Louten, J., *Essential human virology*. 2022: Academic Press.
 13. Zhuang, Q., Wang, S., Liu, S., Hou, G., Li, J., Jiang, W., Wang, K., Peng, C., Liu, D., and Guo, A., *Diversity and distribution of type A influenza viruses: an updated panorama analysis based on protein sequences*. *Virology Journal*, 2019. **16(1)**: p. 1-38.
 14. Chauhan, R.P. and Gordon, M.L., *A systematic review analyzing the prevalence and circulation of influenza viruses in swine population worldwide*. *Pathogens*, 2020. **9(5)**: p. 355.
 15. Sanford, S., Josephson, G., and Key, D., *An epizootic of swine influenza in Ontario*. *The Canadian Veterinary Journal*, 1983. **24(6)**: p. 167.
 16. Bikour, M.H., Frost, E.H., Deslandes, S., Talbot, B., and Elazhary, Y., *Persistence of a 1930 swine influenza A (H1N1) virus in Quebec*. *Journal of general virology*, 1995. **76(10)**: p. 2539-2547.
 17. Bikour, M.H., Cornaglia, E., Weber, J.M., and Elazhary, Y., *Antigenic characterization of an H3N2 swine influenza virus isolated from pigs with proliferative and necrotizing pneumonia in Quebec*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1994. **58(4)**: p. 287.
 18. Carman, S., Stansfield, C., Weber, J., Bildfell, R., and Van Dreumel, T., *H3N2 influenza A virus recovered from a neonatal pig in Ontario--1997*. *The Canadian Veterinary Journal*, 1999. **40(12)**: p. 889.
 19. Grgić, H., Costa, M., Friendship, R.M., Carman, S., Nagy, É., Wideman, G., Weese, S., and Poljak, Z., *Molecular characterization of H3N2 influenza A viruses isolated from Ontario swine in 2011 and 2012*. *Virology journal*, 2014. **11**: p. 1-14.
 20. Grgić, H., Costa, M., Friendship, R.M., Carman, S., Nagy, É., and Poljak, Z., *Genetic characterization of H1N1 and H1N2 influenza A viruses circulating in Ontario pigs in 2012*. *PLoS One*, 2015. **10(6)**: p. e0127840.
 21. Nelson, M.I., Culhane, M.R., Trovão, N.S., Patnayak, D.P., Halpin, R.A., Lin, X., Shilts, M.H., Das, S.R., and Detmer, S.E., *The emergence and evolution of influenza A (H1 α) viruses in swine in Canada and the United States*. *The Journal of general virology*, 2017. **98(11)**: p. 2663.

22. Nfon, C.K., Berhane, Y., Hisanaga, T., Zhang, S., Handel, K., Kehler, H., Labrecque, O., Lewis, N.S., Vincent, A.L., and Copps, J., *Characterization of H1N1 swine influenza viruses circulating in Canadian pigs in 2009*. Journal of virology, 2011. **85**(17): p. 8667-8679.
23. Ma, W., *Swine influenza virus: Current status and challenge*. Virus research, 2020. **288**: p. 198118.
24. La Gruta, N.L., Kedzierska, K., Stambas, J., and Doherty, P.C., *A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection*. Immunology and cell biology, 2007. **85**(2): p. 85-92.
25. Sangpratum, N., Kedkovid, R., Woonwong, Y., Sirisereewan, C., Kedsangakonwut, S., Thanawongnuwech, R., and Arunorat, J., *Dual infection of a Thai isolate HP-PRRSV and the pdmH1N1 2009 SIV in weanling pigs*. The Thai Journal of Veterinary Medicine, 2019. **49**(1): p. 71-79.
26. Kitikoon, P., Vincent, A.L., Jones, K.R., Nilubol, D., Yu, S., Janke, B.H., Thacker, B.J., and 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**(3-4): p. 235-44.
27. Van Reeth, K., Nauwynck, H., and 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**(4): p. 283-92.
28. Van Reeth, K., Nauwynck, H., and 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**(3-4): p. 325-35.
29. Czyzewska-Dors, E., Pomorska-Mol, M., Dors, A., Pluta, A., Podgorska, K., Kwit, K., Stasiak, E., and Lukomska, 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**(4): p. 489-495.

30. Niederwerder, M.C., Jaing, C.J., Thissen, J.B., Cino-Ozuna, A.G., McLoughlin, K.S., and Rowland, R.R., *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, 2016. **188**: p. 1-11.
31. Fan, P., Wei, Y., Guo, L., Wu, H., Huang, L., Liu, J., and Liu, C., *Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2*. Virol J, 2013. **10**: p. 265.
32. Opriessnig, T., Gauger, P.C., Faaberg, K.S., Shen, H., Beach, N.M., Meng, X.J., Wang, C., and Halbur, P.G., *Effect of porcine circovirus type 2a or 2b on infection kinetics and pathogenicity of two genetically divergent strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the conventional pig model*. Vet Microbiol, 2012. **158**(1-2): p. 69-81.
33. Sinha, A., Shen, H.G., Schalk, S., Beach, N.M., Huang, Y.W., Meng, X.J., Halbur, P.G., and Opriessnig, T., *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, 2011. **152**(3-4): p. 235-46.
34. Provost, C., Hamonic, G., Gagnon, C.A., and Meurens, F., *Dual infections of CD163 expressing NPT_r epithelial cells with influenza A virus and PRRSV*. Veterinary microbiology, 2017. **207**: p. 143-148.
35. Dobrescu, I., Levast, B., Lai, K., Delgado-Ortega, M., Walker, S., Banman, S., Townsend, H., Simon, G., Zhou, Y., and Gerdtts, V., *In vitro and ex vivo analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses*. Veterinary microbiology, 2014. **169**(1-2): p. 18-32.
36. Richmond, O., Cecere, T.E., Erdogan, E., Meng, X.J., Pineyro, P., Subramaniam, S., Todd, S.M., and LeRoith, T., *The PD-L1/CD86 ratio is increased in dendritic cells co-infected with porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and the PD-L1/PD-1 axis is associated with anergy, apoptosis, and the induction of regulatory T-cells in porcine lymphocytes*. Vet Microbiol, 2015. **180**(3-4): p. 223-9.
37. Cecere, T.E., Meng, X.J., Pelzer, K., Todd, S.M., Beach, N.M., Ni, Y.Y., and Leroith, T., *Co-infection of porcine dendritic cells with porcine circovirus type 2a (PCV2a) and genotype II*

- porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) induces CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cells in vitro.* Vet Microbiol, 2012. **160**(1-2): p. 233-9.
38. Dorr, P.M., Baker, R.B., Almond, G.W., Wayne, S.R., and Gebreyes, W.A., *Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine.* J Am Vet Med Assoc, 2007. **230**(2): p. 244-50.
39. Wei, H., Lenz, S.D., Van Alstine, W.G., Stevenson, G.W., Langohr, I.M., and Pogranichniy, R.M., *Infection of cesarean-derived colostrum-deprived pigs with porcine circovirus type 2 and Swine influenza virus.* Comp Med, 2010. **60**(1): p. 45-50.
40. Misinzo, G., Meerts, P., Bublot, M., Mast, J., Weingartl, H.M., and Nauwynck, H.J., *Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31.* J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 7): p. 2057-2068.
41. Sanchez, R.E., Jr., Meerts, P., Nauwynck, H.J., and Pensaert, M.B., *Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life.* Vet Microbiol, 2003. **95**(1-2): p. 15-25.
42. Wu, N.-H., Yang, W., Beineke, A., Dijkman, R., Matrosovich, M., Baumgärtner, W., Thiel, V., Valentin-Weigand, P., Meng, F., and Herrler, G., *The differentiated airway epithelium infected by influenza viruses maintains the barrier function despite a dramatic loss of ciliated cells.* Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-12.
43. Nicol, M.Q. and Dutia, B.M., *The role of macrophages in influenza A virus infection.* Future Virology, 2014. **9**(9): p. 847-862.
44. Yu, W.C., Chan, R.W., Wang, J., Travanty, E.A., Nicholls, J.M., Peiris, J.M., Mason, R.J., and Chan, M.C., *Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses.* Journal of virology, 2011. **85**(14): p. 6844-6855.
45. Günther, J. and Seyfert, H.-M. *The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells.* in *Seminars in immunopathology.* 2018. Springer.
46. Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M.R., and Regamey, N., *The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses.* Clinical microbiology reviews, 2011. **24**(1): p. 210-229.

47. Cline, T.D., Beck, D., and Bianchini, E., *Influenza virus replication in macrophages: balancing protection and pathogenesis*. The Journal of general virology, 2017. **98**(10): p. 2401.
48. Ferrari, M., Scalvini, A., Losio, M.N., Corradi, A., Soncini, M., Bignotti, E., Milanese, E., Ajmone-Marsan, P., Barlati, S., Bellotti, D., and Tonelli, M., *Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories*. J Virol Methods, 2003. **107**(2): p. 205-12.
49. Kärber, G., *Tabellen zur näherungsweise Bestimmung von Titern*. Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 1931. **162**: p. 480.
50. Spearman, C., *Review of The Method of 'Right and Wrong Cases' ('Constant Stimuli') without Gauss's Formula*. Psychol Bull, 1909. **6**(1): p. 27-8.
51. Racine, S., Kheyar, A., Gagnon, C.A., Charbonneau, B., and Dea, S., *Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use of the protein in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(4): p. 736-41.
52. Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W., *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature methods, 2012. **9**(7): p. 671-675.
53. Alvarez, F., *Création d'un modèle cellulaire des voies respiratoires du porc pour étudier les effets d'une co-infection virale au virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin et au circovirus porcin*. Master thesis in Papyrus : Institutional Repository of Université de Montréal, Montréal, Canada, 2014.
54. Hernandez Reyes, Y., Provost, C., Traesel, C.K., Jacques, M., and Gagnon, C.A., *Actinobacillus pleuropneumoniae culture supernatant antiviral effect against porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs prior to the viral genome replication and transcription through actin depolymerization*. J Med Microbiol, 2018. **67**(2): p. 249-264.
55. Huang, D., Sherman, B., and Lempicki, R., *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources*. Nature Protoc. , 2009. **4**(1): p. 44-57.

56. Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A., *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. Nucleic acids research, 2009. **37**(1): p. 1-13.
57. Jakab, G.J., *Immune impairment of alveolar macrophage phagocytosis during influenza virus pneumonia*. American Review of Respiratory Disease, 1982. **126**(5): p. 778-782.
58. Nelli, R.K., Dunham, S.P., Kuchipudi, S.V., White, G.A., Baquero-Perez, B., Chang, P., Ghaemmaghami, A., Brookes, S.M., Brown, I.H., and Chang, K.-C., *Mammalian innate resistance to highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection is mediated through reduced proinflammation and infectious virus release*. Journal of virology, 2012. **86**(17): p. 9201-9210.
59. Du, Q., Huang, Y., Wang, T., Zhang, X., Chen, Y., Cui, B., Li, D., Zhao, X., Zhang, W., Chang, L., and Tong, D., *Porcine circovirus type 2 activates PI3K/Akt and p38 MAPK pathways to promote interleukin-10 production in macrophages via Cap interaction of gC1qR*. Oncotarget, 2016. **7**(14): p. 17492-507.
60. Heldt, F.S., Frensing, T., and Reichl, U., *Modeling the intracellular dynamics of influenza virus replication to understand the control of viral RNA synthesis*. Journal of virology, 2012. **86**(15): p. 7806-7817.
61. Gaur, P., Munjal, A., and Lal, S.K., *Influenza virus and cell signaling pathways*. Medical science monitor: international medical journal of experimental clinical research 2011. **17**(6): p. RA148.
62. Liu, S., Li, Q., Qiao, J., Wang, J., Cui, D., Gu, K., Zhou, S., and Li, H., *Endothelial IL-8 induced by porcine circovirus type 2 affects dendritic cell maturation and antigen-presenting function*. Virol J, 2019. **16**(1): p. 154.
63. Gu, C., Gao, X., Guo, D., Wang, J., Wu, Q., Nepovimova, E., Wu, W., and Kuca, K., *Combined Effect of Deoxynivalenol (DON) and Porcine Circovirus Type 2 (Pcv2) on Inflammatory Cytokine mRNA Expression*. Toxins (Basel), 2021. **13**(6).
64. Yang, S., Liu, B., Yin, S., Shang, Y., Zhang, X., Khan, M.U.Z., Liu, X., and Cai, J., *Porcine Circovirus Type 2 Induces Single Immunoglobulin Interleukin-1 Related Receptor (SIGIRR) Downregulation to Promote Interleukin-1beta Upregulation in Porcine Alveolar Macrophage*. Viruses, 2019. **11**(11).

65. Wu, X., Wang, X., Shi, T., Luo, L., Qiao, D., Wang, Z., Han, C., Du, Q., Tong, D., and Huang, Y., *Porcine Circovirus Type 2 Rep Enhances IL-10 Production in Macrophages via Activation of p38-MAPK Pathway*. *Viruses*, 2019. **11**(12).
66. Chang, H.W., Jeng, C.R., Lin, T.L., Liu, J.J., Chiou, M.T., Tsai, Y.C., Chia, M.Y., Jan, T.R., and Pang, V.F., *Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006. **110**(3-4): p. 207-19.
67. Li, W., Liu, S., Wang, Y., Deng, F., Yan, W., Yang, K., Chen, H., He, Q., Charreyre, C., and Audoneet, J.C., *Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to porcine circovirus type 2*. *BMC Genomics*, 2013. **14**: p. 353.
68. Van Reeth, K., Van Gucht, S., and Pensaert, M., *Correlations between lung proinflammatory cytokine levels, virus replication, and disease after swine influenza virus challenge of vaccination-immune pigs*. *Viral immunology*, 2002. **15**(4): p. 583-594.
69. Wang, Z., Chen, J., Zhang, Q.-g., Huang, K., Ma, D., Du, Q., Tong, D., and Huang, Y., *Porcine circovirus type 2 infection inhibits the activation of type I interferon signaling via capsid protein and host gC1qR*. *Veterinary Microbiology*, 2022. **266**: p. 109354.
70. Hasslung, F.C., Berg, M., Allan, G.M., Meehan, B.M., McNeilly, F., and Fossum, C., *Identification of a sequence from the genome of porcine circovirus type 2 with an inhibitory effect on IFN-alpha production by porcine PBMCs*. *J Gen Virol*, 2003. **84**(Pt 11): p. 2937-2945.
71. Vincent, I.E., Balmelli, C., Meehan, B., Allan, G., Summerfield, A., and McCullough, K.C., *Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA*. *Immunology*, 2007. **120**(1): p. 47-56.
72. Choi, C.Y., Choi, Y.C., Park, I.B., Lee, C.H., Kang, S.J., and Chun, T., *The ORF5 protein of porcine circovirus type 2 enhances viral replication by dampening type I interferon expression in porcine epithelial cells*. *Vet Microbiol*, 2018. **226**: p. 50-58.
73. Li, J., Lu, M., Huang, B., and Lv, Y., *Porcine circovirus type 2 inhibits interferon- β expression by targeting Karyopherin alpha-3 in PK-15 cells*. *Virology*, 2018. **520**: p. 75-82.

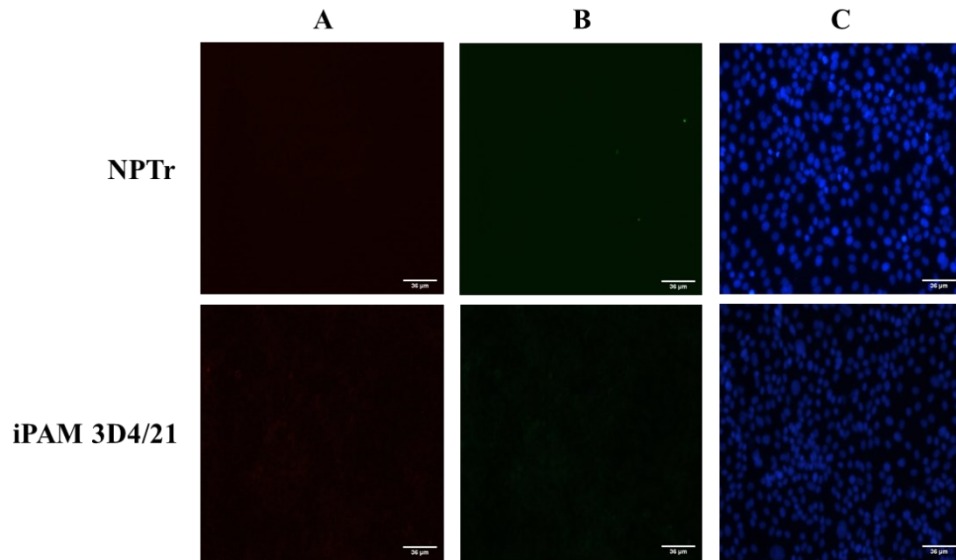
74. Gao, F., Xie, J.L., Jia, C.W., Ren, H.Y., and Zhou, S.H., *Effects of porcine circovirus type 2 and pseudorabies vaccine co-inoculation on regulatory cytokine mRNA expression in pig peripheral blood mononuclear cells*. Genet Mol Res, 2014. **13**(1): p. 1540-7.
75. Chen, M., Han, J., Zhang, Y., Duan, D., and Zhang, S., *Porcine circovirus type 2 induces type I interferon production via MyD88–IKK α –IRFs signaling rather than NF- κ B in porcine alveolar macrophages in vitro*. Research in veterinary science, 2016. **104**: p. 188-194.
76. Huang, B., Zhang, L., Lu, M., Li, J., and Lv, Y., *PCV2 infection activates the cGAS/STING signaling pathway to promote IFN-beta production and viral replication in PK-15 cells*. Vet Microbiol, 2018. **227**: p. 34-40.
77. Wikstrom, F.H., Meehan, B.M., Berg, M., Timmusk, S., Elving, J., Fuxler, L., Magnusson, M., Allan, G.M., McNeilly, F., and Fossum, C., *Structure-dependent modulation of alpha interferon production by porcine circovirus 2 oligodeoxyribonucleotide and CpG DNAs in porcine peripheral blood mononuclear cells*. J Virol, 2007. **81**(10): p. 4919-27.
78. Kekarainen, T., Montoya, M., Dominguez, J., Mateu, E., and Segales, J., *Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses*. Vet Immunol Immunopathol, 2008. **124**(1-2): p. 41-9.
79. Bakre, A.A., Jones, L.P., Murray, J., Reneer, Z.B., Meliopoulos, V.A., Cherry, S., Schultz-Cherry, S., and Tripp, R.A., *Innate Antiviral Cytokine Response to Swine Influenza Virus by Swine Respiratory Epithelial Cells*. Journal of virology, 2021. **95**(15): p. e00692-21.
80. Crosse, K.M., Monson, E.A., Beard, M.R., and Helbig, K.J., *Interferon-stimulated genes as enhancers of antiviral innate immune signaling*. Journal of innate immunity, 2018. **10**(2): p. 85-93.
81. De Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., and Williams, B.R., *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. Journal of leukocyte biology, 2001. **69**(6): p. 912-920.
82. Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M., *A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 481-485.
83. Schoggins, J.W. and Rice, C.M., *Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions*. Current opinion in virology, 2011. **1**(6): p. 519-525.

84. Wu, W., Wang, C., Xia, C., Liu, S., and Mei, Q., *MicroRNA let-7 Suppresses Influenza A Virus Infection by Targeting RPS16 and Enhancing Type I Interferon Response*. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, 2022: p. 937.
85. Fong, C.H.-Y., Lu, L., Chen, L.-L., Yeung, M.-L., Zhang, A.J., Zhao, H., Yuen, K.-Y., and To, K.K.-W., *Interferon-gamma inhibits influenza A virus cellular attachment by reducing sialic acid cluster size*. *Iscience*, 2022. **25**(4): p. 104037.
86. Garcia-Sastre, A., *Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses*. *Virus research*, 2011. **162**(1-2): p. 12-18.
87. Pauli, E.-K., Schmolke, M., Wolff, T., Viemann, D., Roth, J., Bode, J.G., and Ludwig, S., *Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF- κ B-dependent induction of SOCS-3 expression*. *PLoS pathogens*, 2008. **4**(11): p. e1000196.
88. Czerkies, M., Kočańczyk, M., Korwek, Z., Prus, W., and Lipniacki, T., *RSV protects bystander cells against IAV infection by triggering secretion of type I and type III interferons*. *bioRxiv*, 2022: p. 2021.10.11.463877.
89. Kanehisa, M. and Goto, S., *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. *Nucleic Acids Research*, 2000. **28**(1): p. 27-30.
90. Coutermarsh-Ott, S., Eden, K., and Allen, I.C., *Beyond the inflammasome: regulatory NOD-like receptor modulation of the host immune response following virus exposure*. *The Journal of general virology*, 2016. **97**(Pt 4): p. 825.
91. Pandey, K.P. and Zhou, Y., *Influenza A Virus Infection Activates NLRP3 Inflammasome through Trans-Golgi Network Dispersion*. *Viruses*, 2022. **14**(1): p. 88.
92. Tate, M.D. and Mansell, A., *An update on the NLRP3 inflammasome and influenza: the road to redemption or perdition?* *Current opinion in immunology*, 2018. **54**: p. 80-85.
93. Malik, G. and Zhou, Y., *Innate immune sensing of influenza A virus*. *Viruses*, 2020. **12**(7): p. 755.
94. Tate, M.D., Ong, J.D., Dowling, J.K., McAuley, J.L., Robertson, A.B., Latz, E., Drummond, G.R., Cooper, M.A., Hertzog, P.J., and Mansell, A., *Reassessing the role of the NLRP3 inflammasome during pathogenic influenza A virus infection via temporal inhibition*. *Scientific reports*, 2016. **6**(1): p. 1-8.

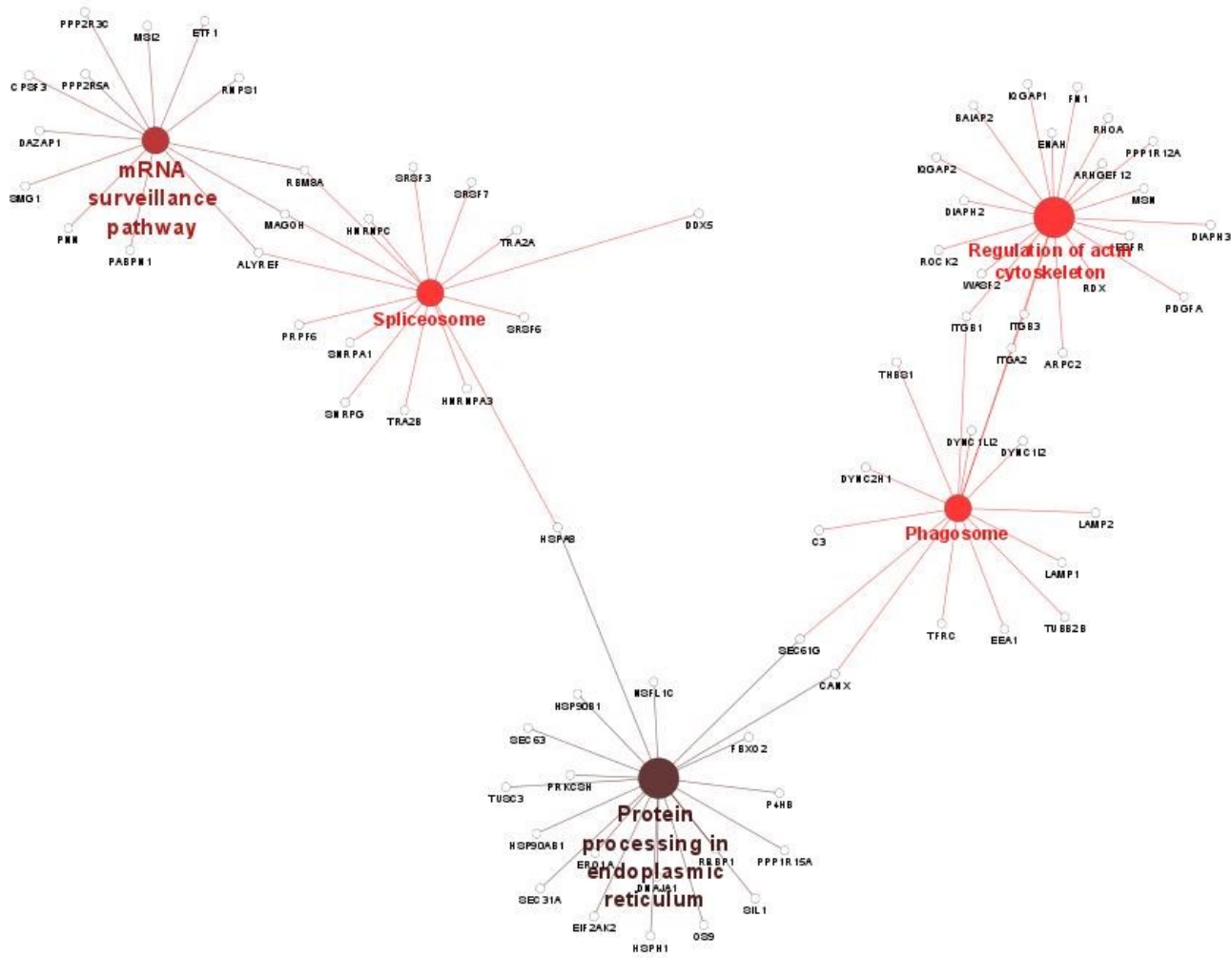
95. Kesavardhana, S., Samir, P., Zheng, M., Malireddi, R.S., Karki, R., Sharma, B.R., Place, D.E., Briard, B., Vogel, P., and Kanneganti, T.-D., *DDX3X coordinates host defense against influenza virus by activating the NLRP3 inflammasome and type I interferon response*. Journal of Biological Chemistry, 2021. **296**.
96. Thulasi Raman, S.N., Liu, G., Pyo, H.M., Cui, Y.C., Xu, F., Ayalew, L.E., Tikoo, S.K., and Zhou, Y., *DDX3 interacts with influenza A virus NS1 and NP proteins and exerts antiviral function through regulation of stress granule formation*. Journal of Virology, 2016. **90**(7): p. 3661-3675.
97. Wurzer, W.J., Planz, O., Ehrhardt, C., Giner, M., Silberzahn, T., Pleschka, S., and Ludwig, S., *Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation*. The EMBO journal, 2003. **22**(11): p. 2717-2728.
98. Kumar, R., Khandelwal, N., Thachamvally, R., Tripathi, B.N., Barua, S., Kashyap, S.K., Maherchandani, S., and Kumar, N., *Role of MAPK/MNK1 signaling in virus replication*. Virus research, 2018. **253**: p. 48-61.
99. Reyes, A., Corrales, N., Gálvez, N.M., Bueno, S.M., Kalergis, A.M., and González, P.A., *Contribution of hypoxia inducible factor-1 during viral infections*. Virulence, 2020. **11**(1): p. 1482-1500.
100. Ren, L., Zhang, W., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, H., Zhu, Y., Meng, X., Yi, Z., and Wang, R., *Influenza A virus (H1N1) infection induces glycolysis to facilitate viral replication*. Virologica Sinica, 2021. **36**(6): p. 1532-1542.
101. Zhao, C., Chen, J., Cheng, L., Xu, K., Yang, Y., and Su, X., *Deficiency of HIF-1 α enhances influenza A virus replication by promoting autophagy in alveolar type II epithelial cells*. Emerging Microbes Infections, 2020. **9**(1): p. 691-706.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

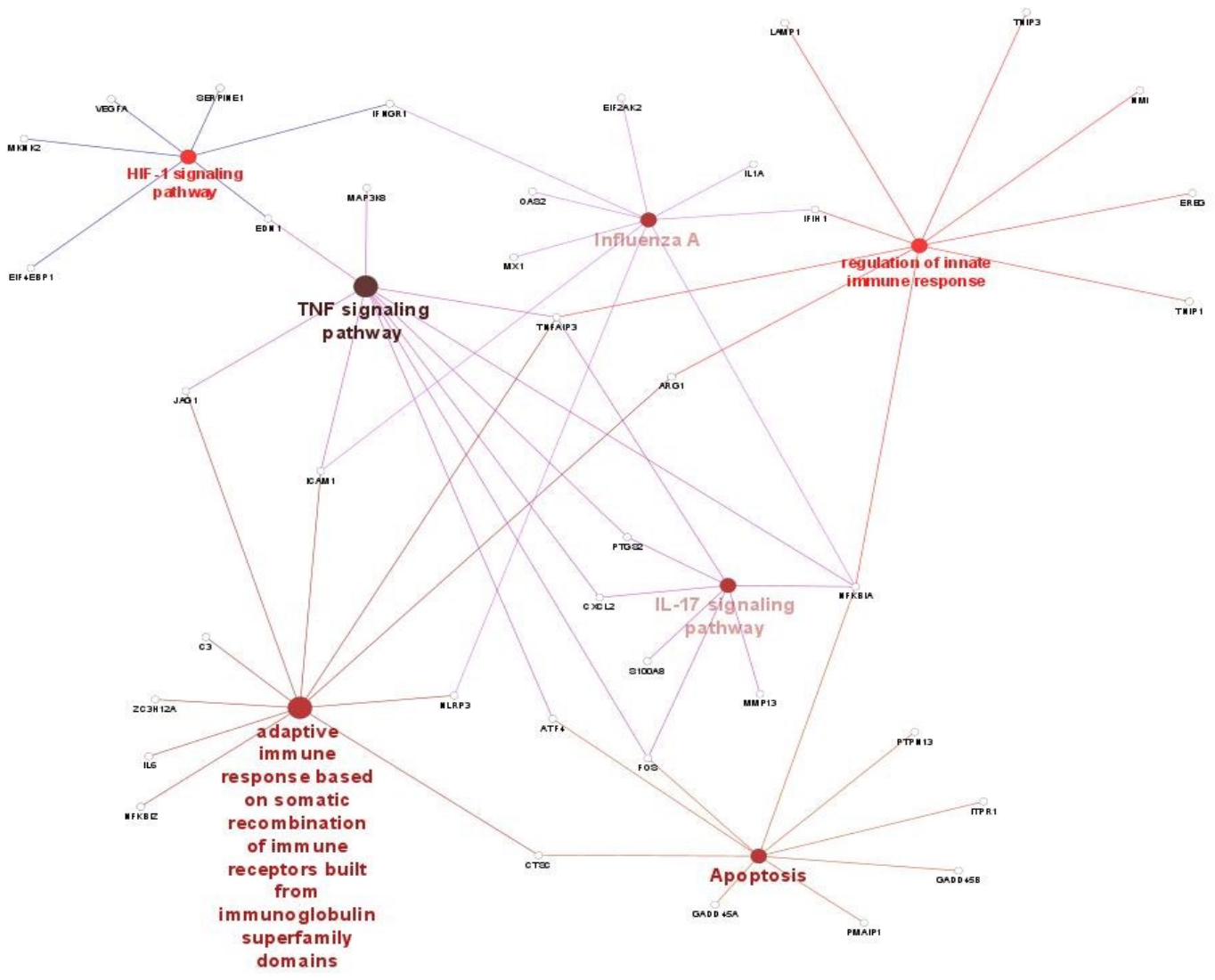
Supplemental figures



Supplemental figure S1. Immunofluorescence assay performed on NPTTr and iPAM 3D4/21 mock-infected cells. A) The NPTTr and iPAM 3D4/21 mock- infected cells were incubated with the polyclonal PCV2 porcine antiserum, followed by and incubation step with a goat anti-swine rhodamine conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, PA, USA), B) The NPTTr and iPAM 3D4/21 mock-infected cells were incubated with the monoclonal mouse anti-NP SwIV primary antibody (Bio-Rad), followed by and incubation step with a goat anti-mouse FITC conjugated secondary antibody (Invitrogen, CA, USA), C) Nuclear staining with DAPI is shown in blue. The immunofluorescence assay was performed as described in the materials and methods section.



Supplemental figure S2. Protein-protein interaction networks and associated cellular pathways on PCV2b/swH1N1 co-infected NPTr cells.



Supplemental figure S3. Protein-protein interaction networks and associated cellular pathways on PCV2b/swH1N1 co-infected iPAM 3D4/21 cells.

Supplemental table S1. List of primers and probe used for PCV2b quantification and primers used in RT-qPCR for cytokines mRNA quantification in NPTr and iPAM 3D4/21 cells

Target	Primers and probes 5'- 3'	References
PCV2 (ORF1)	F: GGC CAC CTG GGT GTG GTA AA R: CCC ACC ACT TGT TTC TAG GTG GTT Probe 6-FAM-TTT GCA GAC CCG GAA ACC ACA TAC TGG A-BHQ-1)	[11]
IL-6	F: ACTCCCTCTCCACAAGCGCCTT R: TGGCATCTTCTCCAGGCGTCCC	[53]
IL-8	F: TGTGAGGCTGCAGTTCTGGCAAG R: GGGTGGAAAGGTGTGGAATGCGT	
IL-10	F: GCTGCGGCGCTGTCATCAATT R: ACCCATGGCTTTGTAGACACCCC	
IFN- α	F: ACTCCATCCTGGCTGTGAGGAAAT R: TCTGTCTTGCAGGTTTGTGGAGGA	[54]
IFN- β	F: CTCTCCTGATGTGTTTCTCC R: GTTCATCCTATCTTCGAGGC	
IFN- γ	F: GAGCCAAATTGTCTCCTTCTAC R: CGAAGTCATTGAGTTTCCAG	
B2M	F: GTGCTATCTCCACGTTTGAG R: GCTTCGAGTGCAAGAGATTG	
B-actin	F: ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT R: ATCTTCATGAGGTAGTCGGTCAGG	
PPIA	F: TGCAGACAAAGTTCCAAAGACAG R: GCCACCAGTGCCATTATGG	

Supplemental table S2. Up-regulated genes in NPTr cells

PCV2b/H1N1		PCV2b		H1N1	
Gene ID	Fold change	Gene ID	Fold change	Gene ID	Fold change
PRDM5	250,86	CCK	161,38	SERPINH1	12,97
CHRNA3	99,44	PRDM5	101,99	SDCBP	10,46
CXCL8	96,60	TGFBR3	20,66	gene:ENSSSCG00000001917	9,15
CXCL2	65,63	gene:ENSSSCG00000046628	18,52	PSMB1	7,91
CCK	62,28	CXCL2	17,51	gene:ENSSSCG00000012119	6,77
VAT1L	53,32	PPP1R14C	17,45	NDRG1	6,51
gene:ENSSSCG00000046628	31,74	DNAJB6	11,12	TACSTD2	5,61
LTF	29,40	PSPH	11,12	SLC25A3	5,27
PPP1R14C	24,66	SNRPA1	10,20	CCN1	5,21
PROK2	22,62	PPP1R10	9,29	FADS2	5,03
CCN2	22,03	TNIP3	9,28	MRFAP1	4,87
PSPH	21,36	EDN1	9,02	TAX1BP3	4,35
IQUB	19,57	DDX52	8,64	SLC50A1	4,30
ALYREF	19,44	ZNF646	8,51	ERBB3	4,20
NPM3	18,04	CSKMT	7,95	MGST3	4,04
IL1A	17,54	gene:ENSSSCG00000047320	7,22	IGFBP2	3,86
SRSF7	16,52	ZNF131	6,99	gene:ENSSSCG00000035570	3,86
MRPL15	15,61	DUSP4	6,57	UNC5B	3,83
PLAU	14,81	SGK1	6,53	ITM2C	3,83
CDC42SE1	14,20	TRIB3	6,53	SKP1	3,73
SEC61G	14,12	RCSD1	6,51	FHL2	3,72
SDCBP	13,51	ZNF12	5,88	CLDN1	3,69
TNIP3	13,13	NCLN	5,79	LGALS3	3,55
RCSD1	13,09	MAGOH	5,79	PTP4A1	3,54
P2RY1	12,59	SRSF6	5,75	ATP5PO	3,45
CSKMT	12,50	ZC3H12A	5,74	PRKAR1A	3,45
CCN1	12,21	ODC1	5,49	ESD	3,33
SGK1	11,82	UBTF	5,45	PICALM	3,32
ZNF646	11,71	CUTC	5,45	FTL	3,28
NSFL1C	11,71	SLC38A2	5,18	NDUFC2	3,26
gene:ENSSSCG00000012119	10,95	GIPC1	5,05	PFKFB3	3,22

CHCHD1	10,89	gene:ENSSSCG00000033786	4,74	HINT1	3,17
ART4	10,64	HSPH1	4,50	PGK1	3,11
SNRPA1	10,09	PTGS2	4,42	MMP13	3,09
GPATCH4	9,91	MED9	4,38	PPP1CB	3,08
DDX52	9,86	AMD1	4,32	NIBAN2	3,07
ANKRD49	9,28	ANKRD1	4,27	DDR1	3,05
gene:ENSSSCG00000051136	9,02	SAFB2	4,26	UBB	2,81
ODC1	8,82	PPP1R15A	4,25	WASL	2,80
TRIB3	8,79	ETS2	4,21	HPS5	2,80
NUDT16	8,73	gene:ENSSSCG00000016733	4,11	RPS29	2,80
MRPS18C	8,68	PCLAF	3,90	gene:ENSSSCG00000017509	2,76
ZNF639	8,68	TNFSF9	3,75	PSAP	2,60
gene:ENSSSCG00000044847	8,36	AAK1	3,75	ITM2B	2,58
RND1	8,35	MAFF	3,74	gene:ENSSSCG00000007743	2,57
CCNB1IP1	8,22	SYS1	3,73	DDIT4	2,57
DUSP4	8,21	WDR74	3,66	HES1	2,54
SLC38A2	8,07	BRIX1	3,66	MMP7	2,46
H2AFZ	7,86	NOP56	3,66	MAL2	2,41
MAGOH	7,85	HSPA8	3,65	gene:ENSSSCG00000014071	2,35
DUSP5	7,64	ELOA	3,64	gene:ENSSSCG00000004489	2,33
MMP13	7,63	NOP58	3,63	NFKBIA	2,29
OSTC	7,46	TNFAIP3	3,62	CST3	2,27
SEMA7A	7,45	PEDS1	3,59	gene:ENSSSCG00000005453	2,22
TGFBR3	7,40	gene:ENSSSCG00000022322	3,52	gene:ENSSSCG000000033697	2,22
PSMB1	7,36	MUC13	3,52	RAC1	2,15
PPP1R15A	7,06	PEA15	3,46	RPLP0	2,12
NOP58	6,97	ZNF207	3,44	PMEP1A	2,09
THOC6	6,81	GATAD2A	3,41	RPL23	2,04
gene:ENSSSCG00000030300	6,70	TCF7L2	3,37	RPS3A	2,00
UGCG	6,69	PDRG1	3,24	RPS25	2,00
CTSC	6,65	GID4	3,23	ALDH1A1	2,00
DYNLT1	6,59	STK4	3,13	RPS7	1,97
WDR74	6,41	RNF44	3,12	RPL34	1,95
PNO1	6,39	gene:ENSSSCG00000034711	3,11	EIF3E	1,95
MCL1	6,38	gene:ENSSSCG00000011803	3,10	TPT1	1,91

PTGS2	6,38	MKNK2	3,10	RPL27	1,85
RELA	6,21	RNPS1	3,07	LAPTM4A	1,83
CDC42EP3	6,19	CTR9	3,06	ENO1	1,82
SRSF6	6,17	CTSC	3,03	SPP1	1,81
NLRP3	6,16	SAT1	2,94	ZFP36L2	1,80
EDN1	6,12	SRXN1	2,89		
NOP56	6,09	RBM8A	2,89		
SAFB2	6,08	ZNFX1	2,87		
AMD1	6,07	POLR3D	2,79		
KRT10	6,03	DDX23	2,79		
PCLAF	5,91	EIF3J	2,78		
gene:ENSSSCG00000050998	5,86	ING3	2,75		
MLLT11	5,86	PSMD7	2,73		
HILPDA	5,84	R3HDM4	2,65		
gene:ENSSSCG00000032059	5,82	ZFP36L1	2,62		
ZNF131	5,76	FUNDC2	2,61		
AKAP8	5,76	DHX38	2,60		
MRPL43	5,76	TXNIP	2,58		
PNP	5,74	ETV3	2,58		
TIMM8B	5,59	SQSTM1	2,48		
TMEM87B	5,51	DDX3X	2,42		
CLDN1	5,43	IDI1	2,35		
TACSTD2	5,36	HBEGF	2,34		
FERMT1	5,31	gene:ENSSSCG00000009211	2,33		
AAK1	5,30	IER3	2,29		
NFKBIA	5,27	TM4SF1	2,29		
gene:ENSSSCG00000029160	5,22	MT1A	2,21		
RBP4	5,19	PSMD8	2,17		
EIF3J	5,16	FNDC7	2,17		
TRAPPC8	5,15	UBE2Q1	2,08		
TFRC	5,15	CD24	1,95		
CUTC	5,15	COX1	1,89		
TNFSF9	5,14				
HSPA8	5,13				
gene:ENSSSCG00000009211	5,11				

PRNP	5,04			
PEDS1	5,02			
S100A8	4,83			
gene:ENSSSCG00000047320	4,81			
GRPEL2	4,76			
gene:ENSSSCG00000017626	4,76			
RPL7L1	4,73			
RAN	4,67			
CYCS	4,64			
ELOA	4,59			
MED9	4,51			
POLR2G	4,49			
SMCR8	4,48			
gene:ENSSSCG00000011803	4,47			
gene:ENSSSCG00000014031	4,43			
SNRPG	4,42			
TRA2A	4,39			
gene:ENSSSCG00000005478	4,30			
gene:ENSSSCG00000033786	4,21			
TXNIP	4,20			
SRSF3	4,15			
gene:ENSSSCG00000022322	4,12			
ERBB3	4,12			
TRA2B	4,11			
RNF220	4,10			
ZC3H12A	4,07			
RNF19B	4,03			
NDUFB1	4,03			
MPHOSPH10	4,03			
HSPH1	4,01			
HINT1	4,00			
MRFAP1	3,98			
OSER1	3,89			
RNF126	3,87			
TRMT13	3,81			

NADK	3,79			
LGALS3	3,76			
VMP1	3,68			
ITPRID2	3,67			
PSMD12	3,65			
SREK1IP1	3,54			
EXOSC1	3,49			
PPP1R14B	3,49			
PTP4A1	3,46			
RIT1	3,41			
DKC1	3,36			
gene:ENSSSCG00000039071	3,33			
RNPS1	3,32			
SNRPB	3,31			
EREG	3,28			
HNRNPA0	3,27			
MAP2K3	3,27			
gene:ENSSSCG00000040889	3,26			
RBM8A	3,25			
SLIRP	3,23			
DHRS9	3,23			
PSMD7	3,20			
BRD2	3,20			
PABPN1	3,19			
TM4SF1	3,18			
MAP7D1	3,14			
HNRNPC	3,13			
PBDC1	3,07			
ITM2B	3,04			
HNRNPA3	3,04			
YTHDF2	3,04			
DDX3X	3,00			
KRR1	2,96			
DENND2C	2,95			
IFNAR1	2,94			

DDX21	2,87				
gene:ENSSSCG00000038359	2,84				
DDX5	2,84				
gene:ENSSSCG00000003079	2,83				
SYS1	2,78				
FHAD1	2,74				
DNAJA1	2,73				
BRIX1	2,72				
H2AZ2	2,72				
SMIM7	2,71				
gene:ENSSSCG00000005453	2,69				
USP1	2,69				
PTBP1	2,68				
gene:ENSSSCG00000034572	2,68				
THBS1	2,62				
DDX27	2,61				
MCM4	2,58				
ETS2	2,54				
ZFP36L1	2,50				
ZNFX1	2,49				
COX7A2	2,49				
RTF1	2,48				
POLR2K	2,46				
PEA15	2,41				
COX1	2,39				
EMP1	2,39				
ETF1	2,38				
MT1A	2,37				
FAM133B	2,34				
BCLAF1	2,34				
POMP	2,31				
MRPL57	2,30				
MKNK2	2,29				
TNFAIP3	2,28				
PSMD8	2,27				

CCT5	2,22				
RSL24D1	2,16				
PRDX1	2,14				
PNN	2,08				
ANXA1	2,07				
gene:ENSSSCG00000000377	2,02				
ATP6	1,88				

Fold change of gene expression in infected cells comparing to control (mock-infected cells).

Supplemental table S3. Down-regulated genes in NPTr cells

PCV2b/H1N1		PCV2b		H1N1	
Gene ID	Fold change	Gene ID	Fold change	Gene ID	Fold change
DIAPH2	-18,95	YPEL2	-21,80	gene:ENSSSCG00000043033	-8,37
SWI5	-18,26	PAPSS1	-18,98	CCDC47	-4,61
CHD6	-14,14	gene:ENSSSCG00000015491	-16,28	ING3	-4,11
FAM114A1	-13,86	ZBTB37	-14,77	UBAP2L	-4,06
PPP1R9A	-13,08	SMARCA2	-13,94	gene:ENSSSCG00000002722	-3,06
YPEL2	-12,59	SFT2D2	-13,77	gene:ENSSSCG00000015337	-2,90
gene:ENSSSCG00000035037	-12,35	NXN	-12,01	EMILIN2	-2,86
RCAN2	-12,06	SLC5A3	-11,40	MICU2	-2,84
SLC5A3	-11,95	SYPL1	-9,79	PSMC3	-2,74
PRKCI	-11,72	PTPRG	-9,59	RBM25	-2,74
SGSM1	-11,45	NET1	-9,39	LAMC1	-2,68
NBAS	-11,43	OS9	-9,14	LAP3	-2,43
GUSB	-10,96	SYNE2	-8,88	HK1	-2,29
SCEL	-10,85	MED4	-8,73	gene:ENSSSCG00000035209	-2,27
PPP2R5A	-10,69	CADM1	-8,66	HSPD1	-2,26
LAMP2	-10,56	EMB	-8,48	EEA1	-2,25
VPS13C	-10,30	HLTF	-8,32	gene:ENSSSCG00000042436	-2,20
KANK2	-9,75	gene:ENSSSCG00000035037	-8,24	gene:ENSSSCG00000022176	-2,19
MTURN	-9,54	CMTM4	-8,20	CCN3	-2,07
TNIK	-9,40	ATP11C	-8,09	gene:ENSSSCG00000043470	-2,07
UACA	-9,32	RCAN2	-7,97	FNBP1L	-2,01
LIMCH1	-9,26	ITGB4	-7,92	gene:ENSSSCG00000036350	-2,01
CADM1	-9,22	SEC31A	-7,92	SMARCC1	-1,90
R3HDM2	-9,15	MYO6	-7,43	PTGES	-1,85
NXN	-8,66	SIL1	-7,43	ITGA2	-1,71
FNBP1L	-8,66	DLG1	-7,20	HSP90AB1	-1,68
PDK3	-8,53	FARP1	-7,09	SYVN1	-1,66
ATP11C	-8,52	SMPDL3B	-7,05		
SGMS2	-8,41	FAM114A1	-7,02		
CGNL1	-8,39	FAM162A	-6,96		
SEC31A	-8,31	gene:ENSSSCG00000040337	-6,91		

GOLM1	-8,17	ATRX	-6,87		
GPC1	-8,13	ARHGAP5	-6,69		
gene:ENSSSCG00000004511	-7,96	DPCD	-6,68		
NF1	-7,79	PMEPA1	-6,59		
SIL1	-7,79	TCEA3	-6,59		
USO1	-7,72	ASH1L	-6,58		
OXR1	-7,67	UBXN1	-6,35		
FCHSD2	-7,66	STRBP	-6,35		
SACM1L	-7,66	SGSM1	-6,18		
SMG1	-7,63	USO1	-6,17		
COPB1	-7,60	PTPRF	-6,16		
ATRX	-7,57	TSPO	-6,07		
SGPP2	-7,57	MTSS1	-6,06		
PPP1R21	-7,54	IQGAP2	-6,05		
gene:ENSSSCG00000012074	-7,54	PRKCI	-5,96		
GPBP1	-7,37	MYOF	-5,91		
gene:ENSSSCG00000026996	-7,34	BIRC6	-5,87		
PPME1	-7,32	MRPL37	-5,83		
SYNE2	-7,32	NBAS	-5,81		
SLC39A10	-7,24	ARHGAP18	-5,81		
EXOC1	-7,17	C3	-5,81		
SLC44A2	-7,13	CEP290	-5,79		
DPP4	-7,09	VPS13C	-5,79		
DCTN2	-7,00	gene:ENSSSCG00000004387	-5,68		
BBX	-6,97	PDK3	-5,67		
PATJ	-6,94	CLSTN1	-5,66		
SPTBN1	-6,89	UTRN	-5,61		
gene:ENSSSCG00000009501	-6,82	ARFIP1	-5,52		
COL5A1	-6,82	PPP1R21	-5,51		
TNRC6B	-6,80	XPO1	-5,48		
CLCN5	-6,74	gene:ENSSSCG00000040990	-5,47		
EIF2AK2	-6,74	CYP20A1	-5,42		
APPL1	-6,71	gene:ENSSSCG00000022032	-5,39		
PCMTD1	-6,70	CPNE3	-5,30		
PALLD	-6,70	KIF20B	-5,25		

STRBP	-6,68	TMEM30A	-5,25		
DTNA	-6,66	ASPH	-5,02		
ATP2B4	-6,65	NPNT	-4,89		
ACBD3	-6,63	DSP	-4,86		
MICU2	-6,58	KANK2	-4,85		
CUEDC1	-6,58	AGRN	-4,83		
ATXN10	-6,57	IGFBP7	-4,81		
MIPEP	-6,54	LIMCH1	-4,71		
gene:ENSSSCG00000015491	-6,54	NDUFS4	-4,63		
ROCK2	-6,44	gene:ENSSSCG00000017509	-4,61		
TGFB1	-6,44	USP8	-4,58		
KCNK12	-6,15	TM9SF4	-4,55		
ROBO1	-6,15	TRMT10A	-4,55		
BICC1	-6,14	MEST	-4,52		
ILRUN	-6,14	SCEL	-4,46		
NAB1	-6,10	gene:ENSSSCG00000012074	-4,46		
ACBD6	-6,09	FNDC3A	-4,44		
NRDC	-6,09	COX7A2L	-4,41		
ZNF292	-6,09	ACAP2	-4,35		
TMEM52	-6,06	gene:ENSSSCG00000026996	-4,35		
RHOA	-5,99	USP14	-4,34		
EGFR	-5,94	CXCL14	-4,27		
DIAPH3	-5,94	F3	-4,18		
C1orf21	-5,92	gene:ENSSSCG00000049831	-4,15		
ARFIP1	-5,79	PRRG1	-4,12		
ASPM	-5,76	CALD1	-4,05		
IQGAP2	-5,75	ITGAV	-4,03		
DYNC2H1	-5,73	ECHS1	-4,03		
SORT1	-5,71	ERC1	-3,99		
ASH1L	-5,67	THRAP3	-3,98		
CFDP1	-5,65	LAMP2	-3,98		
gene:ENSSSCG00000020686	-5,63	ZNF292	-3,95		
JAK1	-5,61	ARHGEF12	-3,95		
LOXL2	-5,55	VIRMA	-3,94		
CPSF3	-5,55	BBX	-3,93		

SFT2D2	-5,53	TPM1	-3,93		
RAI14	-5,53	TEAD1	-3,92		
KIF20B	-5,52	LARS1	-3,90		
UBR4	-5,52	SEMA3C	-3,88		
MYO6	-5,44	CNOT1	-3,85		
CCN3	-5,42	gene:ENSSSCG00000040056	-3,76		
LARS1	-5,41	DCBLD2	-3,75		
ARCN1	-5,38	SGPP2	-3,71		
KRT18	-5,34	TM9SF2	-3,71		
CALD1	-5,34	CDH6	-3,66		
HLA-DRA	-5,33	UBXN4	-3,65		
gene:ENSSSCG00000020872	-5,32	PDK1	-3,65		
UTRN	-5,13	ROCK2	-3,64		
IFT57	-5,13	GOLM1	-3,60		
XPO7	-5,11	CPSF3	-3,57		
PAWR	-5,08	ROBO1	-3,57		
ITPR2	-5,03	IDH2	-3,54		
HK1	-4,95	MAP1B	-3,54		
C3	-4,94	ARFGAP3	-3,52		
RSRC1	-4,89	ADGRG1	-3,52		
NDUFS4	-4,86	AP2B1	-3,50		
DNMT1	-4,85	IGF2BP2	-3,49		
CNOT1	-4,81	VGLL4	-3,49		
ERBIN	-4,81	ACBD3	-3,49		
LAMB3	-4,79	MFF	-3,48		
gene:ENSSSCG00000042436	-4,71	P4HA1	-3,46		
BIRC6	-4,70	LAMB3	-3,44		
gene:ENSSSCG00000001455	-4,66	STAG2	-3,44		
SMARCA2	-4,66	GM2A	-3,43		
KTN1	-4,65	FN1	-3,41		
NAGA	-4,61	SH3GLB1	-3,39		
CALCOCO2	-4,58	LOXL2	-3,38		
gene:ENSSSCG00000015011	-4,57	CCNI	-3,38		
USP14	-4,56	CTNNA1	-3,37		
NES	-4,56	VPS36	-3,36		

ZMYND11	-4,55	DIAPH2	-3,34		
MYOF	-4,53	DYNC1LI2	-3,33		
NUCB1	-4,52	COL5A1	-3,32		
DCDC2	-4,49	PCM1	-3,31		
PPFIBP1	-4,49	CAMK2D	-3,30		
gene:ENSSSCG00000007322	-4,49	JAK1	-3,29		
CCDC80	-4,45	MTURN	-3,29		
IQGAP1	-4,44	gene:ENSSSCG000000034871	-3,27		
PRPF6	-4,44	gene:ENSSSCG000000028092	-3,25		
ARL13B	-4,39	SLC22A18	-3,25		
SEMA3C	-4,39	TPP1	-3,23		
LAMC1	-4,37	RAB10	-3,22		
AP3B1	-4,34	SKIL	-3,21		
PDS5B	-4,33	DTNA	-3,21		
PM20D2	-4,31	PPME1	-3,21		
PTPRG	-4,31	EGFR	-3,21		
FAM13A	-4,31	LAD1	-3,20		
CLTC	-4,27	CETN3	-3,18		
PLOD1	-4,26	SORT1	-3,17		
IDH2	-4,24	SUPT3H	-3,16		
KRT8	-4,23	LAMC2	-3,14		
ARFGAP3	-4,22	LRPAP1	-3,14		
PDK1	-4,19	ENO1	-3,11		
ERC1	-4,19	CD2AP	-3,11		
PFKP	-4,19	TUBB2B	-3,10		
gene:ENSSSCG00000003047	-4,19	KRT14	-3,09		
WDR1	-4,16	NF1	-3,08		
AGRN	-4,16	IQGAP1	-3,07		
FBXO2	-4,15	CD44	-3,07		
ARHGEF12	-4,15	BICC1	-3,07		
STAG2	-4,13	SYT11	-3,05		
RALA	-4,10	ATP6V1C1	-3,03		
EIF2A	-4,08	RAB6A	-3,03		
WASF2	-4,06	FAM13A	-3,01		
STRN	-4,05	CCDC88A	-3,01		

CD2AP	-4,04	BAZ1B	-3,01		
ASCC3	-4,03	BNIP3L	-3,00		
NSMCE1	-4,02	COPB1	-2,99		
TPM1	-4,00	gene:ENSSSCG00000009501	-2,99		
ACAP2	-3,95	DHX29	-2,98		
RIF1	-3,94	ATP2B4	-2,97		
gene:ENSSSCG00000006156	-3,94	APLP2	-2,95		
HLTF	-3,92	DEPDC1B	-2,94		
DLG1	-3,89	RBM26	-2,94		
DDB1	-3,86	ATP1A1	-2,94		
SMPDL3B	-3,86	CALCOCO2	-2,93		
IGF2BP2	-3,85	OPTN	-2,93		
RNF13	-3,84	KIF2A	-2,91		
gene:ENSSSCG00000004387	-3,84	PDGFA	-2,90		
MSI2	-3,81	UACA	-2,87		
HSPG2	-3,79	SMARCC1	-2,86		
OS9	-3,79	ME1	-2,85		
DAZAP1	-3,78	DCTN2	-2,85		
gene:ENSSSCG000000040990	-3,78	EXOC1	-2,84		
ZNF609	-3,77	MICU2	-2,83		
GOLGB1	-3,75	gene:ENSSSCG000000042436	-2,82		
LAD1	-3,74	KRT18	-2,80		
EMILIN2	-3,73	KRT8	-2,79		
EEA1	-3,71	CRK	-2,78		
GOLGA4	-3,70	EIF4G3	-2,77		
FNDC3A	-3,69	ENAH	-2,77		
SLC22A18	-3,64	FNBP1L	-2,76		
TRMT10A	-3,63	PPFIBP1	-2,75		
TRIP11	-3,63	ITGB1	-2,74		
GFPT1	-3,63	ARHGAP29	-2,71		
SRBD1	-3,63	GNB1	-2,71		
UGP2	-3,63	PPIG	-2,71		
ZC3HAV1	-3,63	KTN1	-2,70		
ITGB1	-3,62	RRBP1	-2,69		
GRN	-3,61	CTSH	-2,68		

ENAH	-3,57	gene:ENSSSCG00000008183	-2,68		
APLP2	-3,56	PTBP3	-2,68		
RRBP1	-3,55	CALM3	-2,66		
LRPAP1	-3,54	PRC1	-2,66		
CEP290	-3,54	FLNB	-2,65		
SMARCC1	-3,53	ZRANB2	-2,63		
BHLHE41	-3,52	ITPR2	-2,62		
MAP1LC3A	-3,52	DDX1	-2,61		
POLE4	-3,49	NPEPPS	-2,60		
SKA2	-3,49	ZNF395	-2,57		
SYT11	-3,49	LMO7	-2,56		
CAMK2D	-3,49	KLF10	-2,55		
VEGFA	-3,48	GOLGB1	-2,54		
gene:ENSSSCG00000014909	-3,47	ST13	-2,53		
SUMF1	-3,47	CDC5L	-2,52		
AIRE	-3,47	SLK	-2,48		
gene:ENSSSCG00000001924	-3,47	gene:ENSSSCG000000034853	-2,48		
PCM1	-3,47	SUMF1	-2,48		
NPNT	-3,46	CENPF	-2,47		
PRC1	-3,46	CBX5	-2,46		
ME1	-3,46	ERO1A	-2,44		
FUOM	-3,44	gene:ENSSSCG000000040827	-2,44		
UBXN1	-3,44	P4HB	-2,43		
ITGA2	-3,43	TGFB1	-2,42		
ASPH	-3,41	HSPG2	-2,41		
SLK	-3,41	EVI5	-2,41		
gene:ENSSSCG000000036274	-3,41	ANXA13	-2,37		
DLGAP5	-3,40	EIF2A	-2,36		
gene:ENSSSCG000000038557	-3,40	TAX1BP1	-2,36		
ITGB3	-3,40	SRP72	-2,35		
SMARCC2	-3,40	DHX40	-2,35		
HUWE1	-3,39	COPB2	-2,35		
VWA1	-3,39	gene:ENSSSCG00000003903	-2,35		
EFNB1	-3,38	GLUD1	-2,32		
PTPRF	-3,38	FXR1	-2,32		

EPCAM	-3,36	CFDP1	-2,30		
CXCL14	-3,35	NUCKS1	-2,30		
FN1	-3,34	CPD	-2,30		
ACSL4	-3,34	SEPTIN7	-2,29		
SMS	-3,33	CCN3	-2,28		
gene:ENSSSCG00000038144	-3,32	gene:ENSSSCG00000035209	-2,28		
CPNE3	-3,31	gene:ENSSSCG00000016330	-2,26		
DEPDC1B	-3,31	CCDC80	-2,26		
OPTN	-3,27	BHLHE41	-2,26		
CCDC47	-3,25	FLNA	-2,25		
PPP2R3C	-3,25	PNISR	-2,25		
DST	-3,25	RSF1	-2,23		
CDH6	-3,23	SUCLG2	-2,21		
TCEA3	-3,21	gene:ENSSSCG00000000697	-2,21		
PAPSS1	-3,20	gene:ENSSSCG00000033497	-2,17		
ERO1A	-3,20	gene:ENSSSCG00000007322	-2,17		
DSP	-3,18	gene:ENSSSCG00000017164	-2,14		
BAZ1B	-3,17	VIM	-2,13		
AP2M1	-3,16	PTGES	-2,10		
LAMP1	-3,14	EPCAM	-2,10		
CAP1	-3,13	HK1	-2,10		
gene:ENSSSCG00000040337	-3,13	ANKRD12	-2,06		
ADAM9	-3,13	RDX	-2,06		
VPS35	-3,12	LDHA	-2,04		
BCAM	-3,10	RBPJ	-2,03		
DHX40	-3,09	PDIA3	-1,97		
CPD	-3,08				
TUBB2B	-3,07				
RBBP7	-3,06				
RSF1	-3,04				
gene:ENSSSCG00000002825	-3,03				
VIRMA	-3,03				
CETN3	-2,99				
SHTN1	-2,99				
AP2B1	-2,99				

PTGES	-2,98				
VDAC1	-2,96				
CLGN	-2,96				
COPB2	-2,96				
TPP1	-2,96				
CHD9	-2,96				
CMIP	-2,96				
CCDC181	-2,95				
KRT14	-2,94				
PLEC	-2,94				
PDGFA	-2,94				
RAB6A	-2,93				
COPA	-2,93				
TM9SF4	-2,92				
GLG1	-2,90				
gene:ENSSSCG00000016330	-2,90				
ZNF395	-2,90				
CCDC88A	-2,86				
NUCKS1	-2,84				
PRKCSH	-2,83				
RDX	-2,83				
TLN1	-2,83				
F3	-2,82				
FLNA	-2,80				
P4HA2	-2,80				
USP8	-2,80				
FLNB	-2,80				
gene:ENSSSCG00000017783	-2,78				
gene:ENSSSCG00000035209	-2,78				
PMEPA1	-2,76				
EVI5	-2,76				
HADHA	-2,75				
PSME1	-2,74				
BCAT1	-2,71				
TAX1BP1	-2,71				

PHACTR4	-2,70				
TTC3	-2,70				
gene:ENSSSCG00000007314	-2,70				
BAIAP2	-2,69				
HDAC7	-2,69				
CBX5	-2,67				
CENPF	-2,66				
gene:ENSSSCG00000017164	-2,64				
APP	-2,61				
BRD7	-2,61				
SMC3	-2,60				
SUPT3H	-2,58				
RBPJ	-2,57				
FNDC3B	-2,56				
SEPTIN10	-2,55				
TOP2B	-2,55				
H2AC20	-2,54				
gene:ENSSSCG00000022032	-2,54				
AP1B1	-2,54				
LAP3	-2,53				
CST6	-2,52				
GPD2	-2,52				
NAP1L1	-2,50				
FZD5	-2,49				
SUCLG2	-2,49				
P4HB	-2,49				
FZD6	-2,48				
RNF181	-2,48				
gene:ENSSSCG00000048341	-2,47				
TUSC3	-2,47				
WFDC2	-2,47				
NDFIP1	-2,46				
PTPN11	-2,45				
gene:ENSSSCG00000000261	-2,44				
SEC63	-2,43				

UQCRC1	-2,43				
EIF4G3	-2,42				
NANS	-2,42				
HSPD1	-2,42				
DDX6	-2,42				
gene:ENSSSCG00000000697	-2,41				
gene:ENSSSCG000000040827	-2,41				
HSP90B1	-2,41				
PPP1R12A	-2,41				
H1-0	-2,40				
GLUD1	-2,40				
RAB10	-2,39				
SORBS2	-2,38				
SCD	-2,38				
PNISR	-2,37				
BCL2L1	-2,37				
PDLIM7	-2,37				
VIM	-2,37				
MAP4K4	-2,36				
CCDC186	-2,35				
gene:ENSSSCG000000033385	-2,33				
CAST	-2,33				
gene:ENSSSCG000000005518	-2,32				
MEST	-2,32				
ATP5F1A	-2,31				
RNF19A	-2,31				
ANKRD12	-2,30				
DYNC1LI2	-2,30				
LGALS1	-2,30				
ICAM1	-2,28				
CANX	-2,28				
LDHA	-2,28				
CSDE1	-2,28				
SEPTIN7	-2,27				
MXI1	-2,26				

TMEM50A	-2,25				
LY6D	-2,25				
EIF4B	-2,23				
P4HA1	-2,23				
BAZ2A	-2,23				
EEF1G	-2,23				
SMARCE1	-2,22				
CARHSP1	-2,22				
HSP90AB1	-2,21				
gene:ENSSSCG00000038594	-2,20				
gene:ENSSSCG00000049831	-2,18				
MAP1B	-2,18				
NIPBL	-2,18				
ST13	-2,16				
PSIP1	-2,15				
ARPC2	-2,15				
MSN	-2,14				
VPS28	-2,13				
ALDOA	-2,13				
LMO7	-2,12				
METAP2	-2,10				
PARK7	-2,09				
TOP2A	-2,07				
AKAP9	-2,04				
gene:ENSSSCG00000039658	-2,03				
gene:ENSSSCG00000001930	-2,02				
EIF3F	-2,02				
GAPDH	-2,01				
DYNC1I2	-2,01				
S100A4	-1,98				
PPIG	-1,98				
RPL6	-1,93				
RPS6	-1,78				

Fold change of gene expression in infected cells comparing to control (mock-infected cells).

Supplemental table S4. Up-regulated genes in iPAM 3D4/21 cells

PCV2b/H1N1		PCV2b		H1N1	
Gene ID	Fold change	Gene ID	Fold change	Gene ID	Fold change
FAM124A	246,10	RCS1D1	217,99	CCK	181,02
MX2	235,55	FAM124A	200,88	IL19	98,10
ARG1	200,86	ARG1	195,20	RCS1D1	21,56
VAT1L	182,81	VAT1L	165,05	gene:ENSSSCG00000043470	18,83
CCK	174,13	SLC38A4	134,88	C3	13,90
SLC38A4	146,43	CCK	122,35	TNFAIP3	9,59
RCS1D1	113,02	MX2	110,08	S100A8	9,49
IL19	70,79	IL19	71,13	TNIP3	8,60
CXCL2	35,69	CHRNA	40,13	CXCL2	8,24
ISG15	35,34	ISG15	28,95	NLRP3	8,08
gene:ENSSSCG00000045989	32,50	B3GNT9	26,12	PLET1	6,10
B3GNT9	28,46	gene:ENSSSCG00000049288	23,38	PTGS2	5,96
CHRNA	27,13	CXCL2	22,51	HS3ST1	5,44
gene:ENSSSCG00000022738	20,66	gene:ENSSSCG00000022738	19,10	CD14	4,74
ISG12(A)	19,86	ISG12(A)	18,00	EHF	4,25
gene:ENSSSCG00000032591	17,87	CABP5	17,38	ZC3H12A	4,17
TNFAIP3	17,26	PRDM5	14,94	gene:ENSSSCG0000006588	4,14
PTGS2	17,23	S100A8	13,64	ANKRD1	4,12
TNIP3	15,35	gene:ENSSSCG00000046436	13,33	IL1A	4,05
IQUB	14,65	IQUB	13,08	STYXL1	4,04
IFIT1	14,51	PTGS2	11,41	ZC3H12C	3,99
CABP5	13,45	DHRS9	10,49	ING3	3,66
S100A8	12,59	CCL2	10,48	S100A12	3,55
gene:ENSSSCG00000049288	12,25	NLRP3	10,09	gene:ENSSSCG00000014997	3,54
gene:ENSSSCG00000016733	12,14	TGFBR3	9,79	CHI3L1	3,29
KLF4	11,67	TNFAIP3	9,74	ITPR1	3,24
NLRP3	9,74	ZC3H12A	9,55	ICAM1	3,14
TGFBR3	9,13	gene:ENSSSCG00000032591	9,51	PIGR	3,12
PRDM5	8,96	IFIT1	8,46	F3	2,97
MX1	8,90	PAPPA	7,87	FBXO32	2,94
DHRS9	8,67	gene:ENSSSCG00000047320	7,79	RNF125	2,78

CHAC1	8,61	AGR2	7,74	APIP	2,75
PLET1	8,60	gene:ENSSSCG00000049253	7,63	MX1	2,73
gene:ENSSSCG00000043470	7,98	TNIP3	7,47	gene:ENSSSCG00000020872	2,70
IL1A	7,94	CDC6	7,34	HPS5	2,52
gene:ENSSSCG00000010878	7,52	C3	7,25	TNIP1	2,46
ATP5MC3	7,25	gene:ENSSSCG00000010878	7,11	IER3	2,43
C3	7,21	EDN1	6,92	CD44	2,41
PMAIP1	7,16	MX1	6,30	NFKBIZ	2,37
ATG101	7,02	PSPH	6,23	PLTP	2,34
gene:ENSSSCG00000008929	6,79	MMP13	6,23	TXNRD1	2,32
NUPR1	6,42	gene:ENSSSCG00000017864	6,07	ATF3	2,25
EDN1	6,10	gene:ENSSSCG00000044847	6,07	CFTR	2,18
CDC6	6,09	PLET1	5,92	gene:ENSSSCG00000010954	2,03
gene:ENSSSCG00000047320	6,08	TPST1	5,69	COX1	1,99
SERPINE1	6,05	gene:ENSSSCG00000038304	5,55	TNFRSF1B	1,90
gene:ENSSSCG00000024973	5,82	ND6	5,50	EREG	1,89
TRIB3	5,66	HOOK2	5,45	GSAP	1,84
TPST1	5,63	ATG101	5,36	PADI1	1,84
ANKRD1	5,33	GLP2R	5,22		
OLFML3	5,28	gene:ENSSSCG00000024973	5,19		
RASSF1	5,20	SOX9	5,16		
HS3ST1	5,13	MLLT11	5,11		
IVL	5,12	gene:ENSSSCG00000026210	5,11		
gene:ENSSSCG00000014997	5,06	S100A12	4,91		
IFIT2	5,01	PMAIP1	4,90		
gene:ENSSSCG00000044847	5,01	RASSF1	4,75		
SOX9	4,80	SERPINE1	4,62		
MAP3K8	4,79	MXD1	4,57		
gene:ENSSSCG00000006588	4,73	IVL	4,57		
CHI3L1	4,50	TDG	4,57		
SLC1A4	4,49	RNF19B	4,52		
ZC3H12C	4,39	ANKRD1	4,50		
FOS	4,37	NFKBIA	4,42		
IL6	4,37	RGS2	4,33		
PPP1R15A	4,33	IER3	4,24		

MMP13	4,27	MAP3K8	4,21		
IFIH1	4,18	GMNN	4,18		
gene:ENSSSCG00000012050	4,16	CSKMT	4,09		
IER3	4,09	gene:ENSSSCG00000012050	4,07		
EPST11	4,06	GADD45B	3,95		
LIPG	4,03	IL1A	3,94		
IFNGR1	4,01	AGPAT4	3,93		
EHF	3,99	SEMA7A	3,93		
ITPR1	3,98	gene:ENSSSCG00000006588	3,89		
HERC5	3,98	CCDC80	3,83		
GADD45B	3,95	ZNFX1	3,77		
ING3	3,93	SERTAD1	3,70		
F3	3,91	CHI3L1	3,70		
PLAU	3,88	NFKBIZ	3,69		
CCN2	3,86	CCN2	3,67		
NFKBIA	3,80	HBEGF	3,65		
GADD45A	3,74	RND3	3,65		
ZC3H12A	3,68	IFFO2	3,63		
ATF3	3,68	gene:ENSSSCG00000047164	3,59		
S100A12	3,65	TMPRSS11F	3,47		
PSPH	3,62	THOC6	3,45		
gene:ENSSSCG00000013613	3,61	ZC3H12C	3,44		
NRP2	3,50	ICAM1	3,37		
EGR1	3,40	MAFG	3,35		
TTC9	3,32	SAT1	3,29		
FBXO32	3,29	ADM	3,24		
OAS2	3,27	ZNF131	3,24		
BATF3	3,23	F3	3,22		
gene:ENSSSCG00000009633	3,22	IFNGR1	3,18		
VEGFA	3,21	COX1	3,16		
RND3	3,19	HS3ST1	3,15		
ICAM1	3,14	gene:ENSSSCG00000017106	3,13		
CSKMT	3,10	HPS5	3,11		
JMY	3,08	S1PR1	3,08		
EREG	3,06	CUTC	3,08		

TMPRSS11F	3,02	gene:ENSSSCG00000014997	3,04		
HBEGF	2,99	HERC5	3,02		
CTSC	2,97	APOBEC1	2,89		
SGMS2	2,92	RSRP1	2,88		
NMI	2,89	gene:ENSSSCG00000009633	2,86		
APOBEC1	2,87	gene:ENSSSCG000000033189	2,83		
PLK2	2,86	FJX1	2,81		
TMEM87B	2,85	EPSTI1	2,80		
CENPS	2,82	MMP7	2,80		
CD44	2,81	NUPR1	2,76		
CSTF2	2,80	CCNL1	2,76		
H1-3	2,80	DDX52	2,73		
gene:ENSSSCG00000003079	2,73	EREGL	2,73		
NFKBIZ	2,69	LIPG	2,62		
COX1	2,69	TRIB1	2,61		
MKNK2	2,67	BRIX1	2,61		
MED13	2,56	C1orf52	2,58		
TNIP1	2,54	MALT1	2,58		
ZNFX1	2,53	SIRT7	2,57		
TARS1	2,50	GADD45A	2,56		
HPS5	2,49	OAS2	2,55		
CDCP1	2,35	EHF	2,55		
YPEL2	2,33	RBP4	2,53		
gene:ENSSSCG000000032525	2,30	FST	2,51		
SAT1	2,21	FAM76B	2,48		
BRIX1	2,20	CBX2	2,44		
SAMD9	2,19	SECISBP2L	2,41		
SERPINE2	2,16	AMOTL2	2,41		
JAG1	2,16	PLK2	2,41		
ATF4	2,05	GID4	2,40		
EIF2AK2	2,04	IFITM3	2,39		
PSME2	2,02	TP53RK	2,39		
EIF4EBP1	1,96	TNFSF9	2,38		
EIF3J	1,94	gene:ENSSSCG000000016441	2,38		
ACSL4	1,85	CTSC	2,37		

PADI1	1,83	TMEM87B	2,37		
		WDR74	2,32		
		CFD	2,31		
		TNIP1	2,31		
		JAG1	2,31		
		CSTF2	2,29		
		FKBP4	2,27		
		ATF3	2,25		
		KLF6	2,23		
		R3HDM4	2,20		
		gene:ENSSSCG00000003079	2,19		
		MGLL	2,17		
		AMD1	2,15		
		MAP2K3	2,11		
		gene:ENSSSCG00000017754	2,08		
		BST2	2,07		
		BMP4	2,07		
		FBXO32	2,06		
		FAM177A1	2,06		
		gene:ENSSSCG00000011803	2,05		
		CCND1	2,04		
		CD44	2,03		
		ZFP36L1	2,01		
		gene:ENSSSCG00000028092	2,00		
		IVNS1ABP	1,97		
		ID2	1,96		
		CLDN1	1,95		
		TRIM25	1,93		
		NAMPT	1,92		
		PLEKHN1	1,92		
		MKNK2	1,91		
		TAF1D	1,89		
		EMP1	1,89		
		TRA2B	1,88		
		FSCN1	1,87		

		DNAJB1	1,86		
		SAMD9	1,84		
		SNAPC1	1,84		
		SERPINE2	1,82		
		EIF3J	1,82		
		TM4SF1	1,79		
		SPP1	1,77		
		POLR3D	1,77		
		SDC1	1,73		
		RSRC2	1,68		
		MAP7D1	1,68		
		SRXN1	1,63		
		LLPH	1,59		

Fold change of gene expression in infected cells comparing to control (mock-infected cells).

Supplemental table S5. Down-regulated genes in iPAM 3D4/21 cells

PCV2b/H1N1		PCV2b		H1N1	
Gene ID	Fold change	Gene ID	Fold change	Gene ID	Fold change
MGP	-28,88	SENP5	-9,48	MGP	-39,64
GSTA1	-6,75	MGP	-6,54	WNT16	-4,73
MAP2	-5,32	EPS8	-5,77	BMP7	-4,46
NECTIN1	-4,08	TBC1D5	-5,49	FAM110C	-2,60
SEMA3E	-3,94	PCSK5	-5,47	FIBIN	-2,57
PHACTR2	-3,63	FLRT3	-5,30	SCIN	-2,51
MARCKS	-3,25	WDR11	-4,54	IL1RL1	-2,43
SCIN	-3,03	gene:ENSSSCG00000006725	-4,50	ZBTB20	-2,32
DMXL2	-2,95	ATM	-4,25	MARCKS	-2,10
gene:ENSSSCG00000023325	-2,95	SEMA3E	-4,24	SELENOP	-2,07
BICC1	-2,91	PLXDC2	-3,94	COG3	-2,04
HOMER1	-2,69	PBX3	-3,69	TCEA3	-1,98
KRT14	-2,58	USP13	-3,51	GSTA1	-1,94
SELENOP	-2,58	ARHGAP42	-3,44	PTPN13	-1,92
TCEA3	-2,56	gene:ENSSSCG00000032297	-3,41	C1orf21	-1,76
LAMP1	-2,54	EXOC6B	-3,34		
FARP1	-2,46	PGAP1	-3,32		
WWC1	-2,43	GSTA1	-3,28		
ARHGDIB	-2,29	TUT4	-3,26		
ADAMTS1	-2,27	PPP2R2B	-3,26		
PPP2R5A	-2,25	ASXL2	-3,21		
PLS1	-2,25	MGAT4C	-3,17		
SRPK2	-2,22	MAP2	-3,15		
SMARCA2	-2,13	AGL	-3,13		
PTPN13	-2,03	FAM53B	-3,03		
MET	-2,01	CERT1	-3,01		
TPP1	-2,00	GTF2I	-2,98		
		PCLO	-2,91		
		FAM110C	-2,89		
		HOMER1	-2,89		
		BICC1	-2,86		

		DIP2B	-2,80		
		DMXL2	-2,76		
		WWC1	-2,71		
		PSME3IP1	-2,69		
		TCEA3	-2,69		
		SMARCC2	-2,67		
		NECTIN1	-2,67		
		SLC16A7	-2,66		
		PRKD3	-2,65		
		URI1	-2,65		
		DCDC2	-2,62		
		KIAA1217	-2,61		
		PIBF1	-2,60		
		NRDC	-2,59		
		CASK	-2,58		
		ARL13B	-2,57		
		MGME1	-2,56		
		PTPN13	-2,51		
		PLS1	-2,51		
		gene:ENSSSCG00000010401	-2,50		
		SLC37A4	-2,49		
		IQGAP2	-2,49		
		SREBF2	-2,46		
		ACAP2	-2,46		
		CNKSR2	-2,46		
		SMARCA2	-2,45		
		ZNF644	-2,43		
		LAMP1	-2,43		
		LAMC1	-2,42		
		gene:ENSSSCG00000023325	-2,36		
		R3HDM2	-2,32		
		ARID5B	-2,31		
		SF3A3	-2,28		
		CLCN5	-2,26		
		MAL	-2,26		

		MARCKS	-2,24		
		PKD2	-2,24		
		NDUFV1	-2,23		
		MACC1	-2,22		
		USP47	-2,21		
		NR3C1	-2,19		
		ASPM	-2,19		
		gene:ENSSSCG00000009501	-2,17		
		FARP1	-2,16		
		PALMD	-2,16		
		EML4	-2,15		
		ZMYND11	-2,13		
		ENPP4	-2,11		
		PTPRZ1	-2,11		
		GNS	-2,10		
		ACSL3	-2,08		
		MET	-2,08		
		ARHGEF12	-2,07		
		SELENOP	-2,07		
		AP1B1	-2,07		
		SORT1	-2,06		
		SORBS1	-2,06		
		IGF2BP3	-2,05		
		GLG1	-2,05		
		PPP1R21	-2,05		
		NPNT	-2,05		
		UBR5	-2,01		
		GOLIM4	-2,00		
		AIFM1	-1,99		
		ADD3	-1,99		
		AP3D1	-1,98		
		TEAD1	-1,97		
		gene:ENSSSCG00000017783	-1,97		
		PPP2R5A	-1,96		
		LAMB1	-1,96		

		TTC3	-1,95		
		APLP2	-1,94		
		ITCH	-1,93		
		NECTIN3	-1,93		
		CRIM1	-1,92		
		DDX46	-1,92		
		ECPAS	-1,88		
		CXADR	-1,88		
		RB1CC1	-1,86		
		ATP11C	-1,86		
		FOXN3	-1,84		
		ATP6V1C1	-1,84		
		SLC39A10	-1,82		
		gene:ENSSSCG00000002722	-1,82		
		IRF2BP2	-1,82		
		SYNE2	-1,81		
		SPTBN1	-1,80		
		KRT14	-1,80		
		HNRNPR	-1,80		
		IARS1	-1,79		
		gene:ENSSSCG00000012102	-1,77		
		EHHADH	-1,77		
		RSRC1	-1,75		
		ATRX	-1,71		
		NASP	-1,69		
		MYO6	-1,67		
		PSMD2	-1,66		
		PTGFRN	-1,66		
		CALD1	-1,66		
		SMARCC1	-1,65		
		TOP2B	-1,62		

Fold change of gene expression in infected cells comparing to control (mock-infected cells).

Chapitre 6 - Discussion générale

Le CRP complique le contrôle des problèmes respiratoires dans les élevages porcins, en raison de la présence de multiples agents pathogènes qui interagissent et interfèrent avec les méthodes préventives et prophylactiques [1, 4, 713]. Les infections subcliniques à PCV2 sont très répandues dans les élevages porcins [15], de sorte que des co-infections du PCV2 avec d'autres agents pathogènes sont fréquemment signalées [4, 18, 39, 590, 591, 595]. Les co-infections PCV2b/VSRRP et PCV2b/VIP font partie des combinaisons virus-virus les plus courantes sur le terrain [17, 18, 22, 23, 590, 714, 715]. Les effets observés à la suite de telles co-infections chez les animaux sont: une augmentation de la virémie et de la pathogénèse de PCV2b (co-infection PCV2b/VSRRP) [18], une augmentation des symptômes cliniques associés à l'infection par le VIP (co-infection PCV2b/VIP) [10], une modulation des réponses immunitaires [5, 6, 51, 597-599] et une altération des réponses à la vaccination [43, 431].

Différentes études ont été réalisées *in vitro* pour comprendre les effets et les mécanismes impliqués dans la pathogénèse des co-infections virales. En ce qui concerne l'effet de la double infection par le PCV2 et le VSRRP, la plupart de ces études ont été réalisées sur des macrophages porcins [51, 716-718]. Cependant, les antigènes du VSRRP ont été observés dans certains types de cellules pulmonaires telles que les cellules épithéliales bronchiolaires, les pneumocytes desquamés, y compris certaines cellules syncytiales et les cellules épithéliales du parenchyme pulmonaire [340-342, 719]. À notre connaissance, les études portant sur l'impact de la co-infection simultanée par le PCV2b et le VSRRP dans les cellules épithéliales respiratoires porcines sont très limitées. D'autre part, il n'y a pas de rapports sur les effets de la co-infection du PCV2b et du VIP *in vitro*, que ce soit sur les macrophages ou les cellules épithéliales.

Les objectifs de mon projet de recherche de doctorat étaient de comprendre les mécanismes de la pathogénèse de la co-infection PCV2b/VSRRP et PCV2b/VIP *in vitro*. La lignée cellulaire NPTr-CD163 a été utilisée comme modèle de cellules épithéliales respiratoires porcines pour étudier la co-infection PCV2b/VSRRP. Cette lignée cellulaire modifiée exprime le CD163, un récepteur cellulaire important du VSRRP, ce qui rend ces cellules sensibles à l'infection par le VSRRP. Les

lignées cellulaires NPTr (sans CD163) et iPAM 3D4/21 ont été utilisées lors de l'étude de la co-infection PCV2b/VIP.

Les cellules ont été préalablement infectées par le PCV2b afin d'obtenir des cellules infectées de façon persistante avec ce virus, avant la co-infection par le VSRRP ou le VIP. Cette approche a permis d'étudier les cellules co-infectées par le PCV2b/VSRRP et le PCV2b/VIP, même si les virus à l'étude possèdent différentes cinétiques de réplication [150], Influenza virus intracellular replication dynamics, release kinetics, and particle morphology during propagation in MDCK cells [720, 721]. De plus, cette stratégie ressemble à la dynamique des co-infections virales sur le terrain où les infections subcliniques au PCV2b sont très répandues et surviennent très rapidement au jeune âge chez les porcelets et donc que les animaux sont souvent infectés par le PCV2b avant d'être infectés par le VSRRP ou le VIP.

Pour évaluer l'impact des co-infections dans la pathogenèse virale, différents paramètres ont été caractérisés dans les cellules co-infectées et comparés aux cellules infectées par un seul virus. Dans ce contexte, la réplication virale, la viabilité cellulaire, l'expression transcriptionnelle des cytokines, l'expression différentielle de gènes cellulaires et la modulation des voies de signalisation cellulaires ont été évalués.

6.1 Modulation de la réplication virale dans les cellules co-infectées PCV2b/VSRRP et PCV2b/VIP

Les résultats de la présente étude ont montré que le VSRRP peut infecter et se répliquer dans une population de cellules épithéliales précédemment infectées par le PCV2b.

Dans le modèle de co-infection PCV2b/VSRRP de la présente étude, la réplication du PCV2b a été significativement augmentée dans les cellules NPTr-CD163 par rapport aux cellules infectées uniquement par le PCV2b. En revanche, la réplication du VSRRP a été significativement diminuée dans les cellules co-infectées par rapport aux cellules infectées uniquement par le VSRRP.

Ces résultats sont similaires à ce qui a été observé *in vivo*, où une augmentation de la réplication et de la virémie du PCV2b chez les porcs co-infectés par le PCV2b et le VSRRP a été démontré, par rapport aux porcs infectés uniquement par le PCV2b [9, 722]. Cependant, il n'y a pas de consensus

sur l'effet du PCV2b sur la réplication du VSRRP. Les résultats de notre étude sont en accord avec les études de Chang *et al.* (2005), et de Tsai *et al.* (2012), qui ont montré une diminution des antigènes du VSRRP au cours de la co-infection PCV2b/VSRRP (dans les PAM, dans le cas de ces études) [51, 718]. En revanche, selon l'étude de Rovira *et al.* (2002), le PCV2 pourrait favoriser la réplication du VSRRP, compte tenu d'une durée plus longue de la virémie du VSRRP et d'une proportion plus élevée de porcs virémiques observée chez les animaux co-infectés expérimentalement [168]. D'autre part, d'autres études ont indiqué que l'infection par le VSRRP ne serait pas influencée par l'infection avec le PCV2 [222, 723].

Dans l'ensemble, les différents effets de la co-infection PCV2/VSRRP sur la réplication du VSRRP reflètent la complexité des interactions entre les deux virus au niveau cellulaire et au niveau de l'animal. La réalisation d'autres études seront nécessaires pour bien comprendre l'impact du PCV2b sur l'infection par le VSRRP.

Les cellules respiratoires épithéliales porcines et les macrophages alvéolaires peuvent être infectés par le PCV ainsi que par le VIP [32-36]. L'infection productive des virus de l'influenza dans les cellules épithéliales des voies respiratoires favorise la dissémination du virus et le développement de la maladie, tandis que dans les macrophages [724] l'infection du VIP peut modifier les fonctions antivirales de ces cellules comme la phagocytose, ce qui peut entraîner une aggravation de la maladie et une altération de la clairance bactérienne lors d'une infection bactérienne secondaire [725, 726]. Lors d'une étude avec des porcs nés par césarienne et privés de colostrum, puis infectés expérimentalement avec le PCV2, suivi d'une infection avec une souche H1N1 du VIP, Wei *et al.* (2010) ont montré que l'infection par le VIP n'influçait pas la réplication du PCV2 chez les porcs doublement infectés [10]. Néanmoins, l'infection avec le PCV2 a augmenté la maladie clinique liée au VIP chez les porcs co-infectés avec PCV2/VIP par rapport au groupe d'animaux infectés uniquement avec le PCV2. Cependant, dans cette étude, l'absence d'un groupe contrôle infecté uniquement avec le VIP n'a pas permis de déterminer l'impact direct du PCV2 sur la réplication du VIP.

Lors de nos expériences de co-infection PCV2b/VIP, la réplication du PCV2b n'a pas été influencée par des souches de VIP des sous-types H1N1 et H3N2, dans les cellules NPTr ou dans les iPAM

3D4/21 co-infectées. Cependant, le PCV2b a modulé la réplication des deux souches du VIP testées dans les cellules co-infectées. Fait intéressant, l'impact du PCV2b sur l'infection du VIP variait selon le type de cellule. Alors que la réplication du VIP a diminué dans les cellules NPTr co-infectées, elle a été augmentée dans les iPAM 3D4/21 doublement infectés. Ces résultats suggèrent que la co-infection PCV2b/VIP peut avoir un impact différent sur la réplication du VIP selon le type de cellules infectées.

6.2 Impact de la co-infection PCV2b/VSRRP et PCV2b/VIP sur la viabilité cellulaire et l'expression des ARNm de certaines cytokines

Les infections virales peuvent induire la prolifération cellulaire ou diminuer la viabilité cellulaire selon le stade du cycle de réplication viral. Déterminer la viabilité cellulaire permet d'avoir une idée sur l'état de santé de la cellule infectée et sur son activité métabolique. Une bonne viabilité cellulaire est importante pour la réplication des virus lors des premiers stades de l'infection, mais aussi pour le maintien des fonctions biologiques de la cellule.

Dans cette étude, la viabilité cellulaire a été déterminée dans les cellules co-infectées et comparée à celle des cellules infectées par un seul virus. Compte tenu du fait que la réplication du PCV2b était augmentée et que la réplication du VIP était modulée dans les cellules co-infectées par PCV2b/VSRRP et PCV2b/VIP, respectivement, on s'attendait à ce que la viabilité cellulaire soit modulée en conséquence. Les résultats obtenus dans cette étude ont mis en évidence que les infections par le PCV2b et le VIP diminuent progressivement la viabilité cellulaire. Les co-infections du PCV2b avec le VSRRP ou le VIP ont également diminué la viabilité cellulaire, cependant, contrairement aux résultats attendus, aucune différence significative n'a été observée entre les cellules co-infectées et les cellules infectées uniquement par le PCV2b.

De plus, la mono-infection par le VSRRP n'a pas affecté la viabilité des cellules NPTr-CD163, contrairement à ce qui a été rapporté dans les cellules MARC-145, où le virus provoque la mort cellulaire autour de 48 hpi [727, 728]. Ce résultat n'est pas surprenant, car des études antérieures de notre laboratoire ont démontré que le VSRRP ne provoque pas d'effets cytopathiques dans

les NPTr-CD163 [729]. Cette observation suggère que la diminution de la viabilité cellulaire observée dans les cellules co-infectées PCV2b/VSRRP est principalement due au virus PCV2b.

Outre l'impact des co-infections virales sur la viabilité cellulaire, on a également étudié l'impact de ces infections mixtes sur l'expression de l'ARNm de cytokines médiatrices de l'inflammation et de la réponse antivirale. Il faut mentionner que les cellules épithéliales du tractus respiratoire jouent un rôle important dans la détection des pathogènes respiratoires viraux. La détection de ces pathogènes grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires et la libération de cytokines anti/pro-inflammatoires, permet de recruter et activer les cellules de l'immunité innée pour finalement déclencher des réponses immunitaires innées et adaptatives [730, 731]. D'autre part, les macrophages sont impliqués dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes envahissants. Ce sont des cellules phagocytaires professionnelles qui phagocytent les particules infectieuses, éliminent les cellules apoptotiques et participent à la réponse immunitaire adaptative par l'activation des lymphocytes T via la présentation d'antigènes [726].

Les cytokines induites par une infection virale modulent un large éventail de fonctions biologiques, notamment l'inflammation, la prolifération, la réparation, la différenciation cellulaire et ainsi l'immunité innée et adaptative. Une réponse immunitaire robuste est essentielle pour la clairance virale, mais une production dérégulée ou excessive de cytokines est associée à une immunopathologie, caractérisée par des dommages aux tissus et une morbidité accrue [540, 732]. Les virus peuvent moduler la production de cytokines pour échapper aux réponses immunitaires. De plus, il est connu que les co-infections virales peuvent altérer l'expression des cytokines, ce qui peut avoir des effets variés sur la réplication virale [193, 194, 196, 388-390, 529, 733].

Dans cette étude, l'expression de l'ARNm de l'IL-6, IL-8, IL-10, IFN- α , IFN- β et IFN- γ a été quantifiée et comparée entre les cellules mono-infectées et co-infectées. Ces cytokines ont été évaluées étant donné que plusieurs études rapportent une association entre la modulation de leur expression et l'altération de la réponse inflammatoire et antivirale de l'hôte *in vitro* et *in vivo*, à la suite d'une infection par le PCV2, le VSRRP ou le VIP [193, 194, 196, 388-390, 529, 733]. Il a été observé qu'après l'infection par le PCV2b, l'expression des ARNm de l'IL-6 et IL-10 ont

augmenté dans les cellules NPTr et les iPAM 3D4/21, ce qui est conforme aux rapports précédents [193, 194, 196]. En revanche, l'expression de l'ARNm de l'IL-8 a été augmentée dans les cellules NPTr mais pas dans les iPAM 3D4/21, à la suite de l'infection par le PCV2b, comparativement aux cellules non-infectées. Ces résultats diffèrent d'autres études qui ont montré une surexpression de l'IL-8 dans les macrophages alvéolaires porcins primaires infectés par le PCV2 [195, 734]. Il est à noter que dans la présente étude, les infections virales ont été réalisées dans des cellules PAM immortalisées au lieu de PAM primaires. Les résultats contradictoires entre la présente étude et les précédentes [195, 734] peuvent être dus à des différences au niveau de la modulation d'expression de l'IL-8 après une infection par le PCV2b. Une autre explication pourrait être que la réponse immunitaire peut varier, au moins partiellement, entre les cellules infectées par le PCV2b de manière persistante (type d'infection par le PCV2b utilisé dans la présente étude) et les cellules infectées par le PCV2b de manière non persistante. Ces hypothèses restent à être confirmées.

En ce qui concerne l'expression des cytokines antivirales, une modulation de l'expression de l'ARNm des IFNs par le PCV2b dépendante du type cellulaire a été démontrée dans la présente étude. Dans les cellules NPTr, les niveaux d'expression de l'ARNm des IFNs types I et II étaient significativement augmentés, tandis que dans les iPAM 3D4/21, une tendance à une réduction de l'expression de l'ARNm des ces IFNs a été mise en évidence. Les rapports sur la modulation de la réponse IFN à la suite d'une infection par le PCV2b dans la littérature sont contradictoires. Wang *et al.* (2022) ont signalé que l'infection par le PCV2 interfère avec l'activation de la voie de signalisation des IFNs de type I et inhibe l'expression des ISG induites par les IFNs *in vivo* et *in vitro* [201]. De plus, des études précédentes ont rapporté une inhibition de l'IFN- α dans les cellules mononucléaires du sang périphérique porcine (PBMC) [202, 735] et une inhibition de l'IFN de type I (IFN- α / IFN- β) dans les cellules PK-15 [145, 203] après une infection par le PCV2 ou en présence de protéines virales ou d'ADN de PCV2. Inversement, d'autres études *in vitro* ont montré que le PCV2 induit la production d'interféron de type I dans les macrophages alvéolaires porcins [205] et l'IFN- β dans les cellules PK-15 [206]. Il a été rapporté que le génome du PCV2 contient des motifs CpG ayant à la fois des propriétés inhibitrices et stimulantes de l'IFN- α [207]. De plus, Kekarainen *et al.* (2008) ont suggéré que les éléments viraux du PCV2 peuvent réguler différemment la production de cytokines en fonction de la population cellulaire [208]. Dans

l'ensemble, les études préalablement mentionnés, ainsi que les résultats de la présente thèse, ont mis en évidence les différences et la complexité de la modulation de la réponse IFN dans les cellules épithéliales par rapport aux macrophages après une infection par le PCV2b.

En ce qui concerne l'infection par le VSRRP dans les cellules NPTr-CD163, une surexpression de l'ARNm de l'IL-8 et de l'IL-10 a été observée dans les cellules infectées, mais aucune modulation n'a été observée pour l'IL-6. Plusieurs études ont rapporté une régulation à la hausse de l'IL-6, de l'IL-8 et de l'IL-10 après une infection par le VSRRP [376, 378, 379, 412, 736, 737]. En ce qui concerne l'expression de l'IL-6, nos résultats sont similaires à ceux de Díaz *et al.* (2012) qui n'ont observé aucune modulation de l'IL-6 chez les porcs infectés expérimentalement [377].

La suppression de l'interféron de type I après une infection par le VSRRP a été préalablement rapportée [390]. Dans la présente étude, une surexpression de l'ARNm des IFNs de type I (α/β) lors de la mono-infection par le VSRRP dans les cellules NPTr CD-163 n'a pas été observé, comparativement aux cellules non-infectées. Il est connu que les interférons de type I inhibent la réplication du VSRRP [388, 389]. Compte tenu de cela, on pourrait émettre l'hypothèse que la suppression de la réponse des IFN de type I dans les cellules NPTr-CD163 pourrait favoriser la réplication du VSRRP dans ces cellules.

L'induction de cytokines pro-inflammatoires lors d'une infection par le VIP a précédemment été corrélée à la réplication virale et à l'apparition de signes cliniques chez les animaux infectés [529]. Pomorska-Mól *et al.* (2014), ont étudié les réponses inflammatoire et immunitaire porcine au cours de la grippe aiguë causée par une souche H1N1 de VIP chez des porcs infectés expérimentalement [539]. Ces auteurs ont constaté que, dans l'ensemble, les concentrations locales d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10 et d'IFN- γ étaient augmentées chez les porcs inoculés par le VIP H1N1. En accord avec ces résultats, une augmentation de la concentration pulmonaire d'IFN- α , d'IFN- γ , d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-10 a également été signalée par Turlewicz-Podbielska *et al.* (2021) après une infection expérimentale de porcs par le VIP H1N1 [540].

Dans la présente étude, une modulation de l'expression de l'ARNm des cytokines par le VIP a été observé et celle-ci est dépendante de la souche virale de VIP et du type cellulaire infecté. Dans les cellules NPTr, l'expression de l'ARNm d'IL-6, de l'IFN- α et de l'IFN- γ ont augmenté après

l'infection par VIP des géotypes H1N1 et H3N2. L'expression de l'ARNm de l'IL-10, en revanche, a été augmentée lors de l'infection avec la souche H3N2, mais pas avec la souche H1N1. De plus, l'ARNm de l'IFN- β a été surexprimé par la souche virale H1N1 et non par la souche virale H3N2.

Lors de nos expériences, l'expression de l'ARNm de l'IL-8 a été modulée selon le type cellulaire. Dans les iPAM 3D4/21, contrairement aux cellules NPT_r, l'IL-8 a été surexprimé par les deux souches deVIP (géotypes H1N1 et H3N2). En fait, dans les iPAM 3D4/21, le VIP H1N1 a induit une surexpression de presque toutes les cytokines analysées, à l'exception de l'IFN- α . Dans le cas du VIP de géotype H3N2, l'infection des iPAM 3D4/21 a provoqué une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IFN- β , contrairement aux cellules NPT_r. D'autre part, le niveau d'ARNm de l'IL-10 a été surexprimé dans les NPT_r mais pas dans les iPAM 3D4/21 par le VIP H3N2. La modulation différentielle de l'expression des cytokines par le VIP H3N2 dans les cellules épithéliales par rapport aux macrophages a été préalablement rapportée [37].

L'un des objectifs de cette étude était de corroborer l'hypothèse selon laquelle l'infection mixte par le PCV2b et le VSRRP ou le VIP entraînerait une modulation des réponses des cytokines par rapport à la mono-infection avec ces virus. Les résultats obtenus des expériences de co-infection réalisées dans ce projet de thèse ont permis de corroborer cette hypothèse, car une augmentation significative de l'expression d'IL-6 et d'IL-8 a été observée dans les cellules NPT_r-CD163 co-infectées par PCV2b/VSRRP comparés aux cellules mono-infectés. Ces résultats suggèrent que l'infection mixte avec le PCV2b et le VSRRP pourrait augmenter la réponse pro-inflammatoire, ce qui pourrait avoir en retour un impact sur la sévérité de la maladie respiratoire chez les animaux co-infectés. Fait intéressant, l'expression de l'ARNm des IFNs de type I (α/β) était significativement plus faible dans les cellules co-infectées par le PCV2b/VSRRP que dans les cellules infectées uniquement par le PCV2b. La réduction de l'expression des IFNs de type I (α/β) dans les cellules co-infectées pourrait être due au VSRRP, qui est connu pour altérer les réponses des IFNs de type I [390]. Néanmoins, l'expression de ces cytokines est restée significativement plus élevée dans les cellules co-infectées par rapport aux cellules infectées uniquement par le VSRRP. Cela pourrait expliquer la réduction de la réplication du VSRRP observée dans les cellules co-infectées, comparativement aux cellules mono-infectés, car il est connu que les interférons de type I inhibent la réplication du VSRRP [388, 389].

Une modulation différentielle de l'expression de l'ARNm de certaines cytokines à l'étude a également été observée dans les cellules co-infectées par PCV2b/VIP. Un effet synergique du PCV2b et du VIP sur la réponse IFN a été mis en évidence dans les cellules NPTr. Dans ces cellules, la co-infection PCV2b/VIP a induit une surexpression de toutes les cytokines testées indépendamment du génotype de VIP. L'expression de l'ARNm des IFNs de type I et II était significativement plus élevées dans les NPTr co-infectées par PCV2b/VIP H1N1 (IFNs type I et II) et PCV2b/VIP H3N2 (IFNs type I), que dans les cellules infectées uniquement par le PCV2b ou le VIP (H1N1 ou H3N2).

Il est connu que les IFNs libérés après une infection par le VIP activent la voie de signalisation JAK-STAT. Cela déclenche la transcription de centaines de gènes stimulés par les IFNs (ISG), qui induisent un « état antiviral » dans les cellules infectées et voisines pour finalement restreindre la réplication et la propagation virales [738-742]. Dans une étude réalisée par Wu *et al.* (2022), l'augmentation de l'expression des IFNs de type I a entraîné une inhibition de l'infection par le virus de l'influenza [743]. De plus, Fong *et al.* (2022), ont montré que l'IFN- γ inhibe la réplication du virus de l'influenza dans les cellules épithéliales respiratoires en réduisant la liaison du virus aux cellules [744]. Compte tenu de cela, on pourrait expliquer la réduction du titre du VIP observée dans les cellules NPTr co-infectées PCV2b/VIP dans notre étude, par rapport aux cellules infectées uniquement par le VIP, comme un résultat de l'augmentation significative de l'expression de l'ARNm des IFNs dans les cellules co-infectées. Czerkies *et al.* (2022), ont signalé une interférence entre le virus respiratoire syncytial (VRS) et le virus de l'influenza de sous-type H1N1 dans les cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549). Fait intéressant, ils ont constaté que l'infection préalable des cellules par le VRS n'empêchait pas une infection ultérieure par le virus de l'influenza, mais que le VRS protégeait effectivement les cellules voisines contre l'infection par le virus de l'influenza en déclenchant la sécrétion d'interférons de type I et de type III [745]. Un effet similaire dans les cellules NPTr co-infectées PCV2b/VIP pourrait expliquer la réduction, du VIP dans les cellules co- infectées par rapport aux cellules infectées uniquement par le VIP.

Inversement, dans les cellules iPAM 3D4/21 co-infectées, le PCV2b a complètement inhibé l'expression des ARNm des IFNs de type I et de type II induit après l'infection par le VIP H3N2 et

de l'IFN- β et de l'IFN- γ induit après l'infection par le VIP H1N1. Gao *et al.* (2014), ont signalé un effet similaire du PCV2 sur l'expression des IFNs pendant l'infection mixte avec le PCV2 et le virus de la pseudo-rage (PRV) dans des PBMCs porcins [204]. Dans cette précédente étude, le PCV2 a inhibé de manière significative la capacité du PRV inactivé à induire l'expression de l'IFN- γ . Les auteurs ont suggéré que le PCV2 pourrait affecter la réponse immunitaire cellulaire au PRV. Dans le contexte de la présente étude, on pourrait suggérer que l'inhibition de la réponse de l'IFN observée chez les iPAM 3D4/21 préalablement infectés par le PCV2b, puis par le VIP, pourrait expliquer l'augmentation de la réplication de VIP dans ces cellules.

6.3 Modulation différentielle de l'expression des gènes et des voies de signalisation cellulaires dans les cellules co-infectées par rapport aux cellules mono-infectées

Les virus modulent l'environnement des cellules hôtes, ce qui leur permet d'échapper à la réponse immunitaire et favorise leur réplication. Pour mieux comprendre la pathogenèse virale, il est nécessaire de comprendre les interactions entre les virus et la cellule hôte. L'analyse du transcriptome des cellules lors des infections virales permet d'identifier les réseaux de gènes qui peuvent être impliqués lors d'une infection virale.

Dans la présente étude, le séquençage de l'extrémité 3' des ARNm cellulaires a été effectué dans le but d'identifier les gènes exprimés de manière différentielle et les voies biologiques significativement impactées dans les cellules co-infectées, par rapport aux cellules infectées par un seul virus. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence des aspects importants des interactions virus-cellule hôte ainsi que des mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de l'infection virale au cours des co-infections PCV2b/VSRRP et PCV2b/VIP.

Dans cette étude, l'analyse des gènes différentiellement exprimés (DEGs) dans les cellules NPTr-CD163 co-infectées a montré que la double infection par PCV2b et VSRRP modulait l'expression de 84 gènes cellulaires, par rapport aux cellules non infectées. L'analyse du nombre de DEGs impliqués dans 5 systèmes biologiques (KEGG) connus a montré que le plus grand nombre de gènes modulés (exprimé en pourcentage dans la figure) lors d'infections virales étaient impliqués

dans le traitement de l'information génétique, le traitement de l'information environnementale et dans les processus cellulaires (Figure 1).

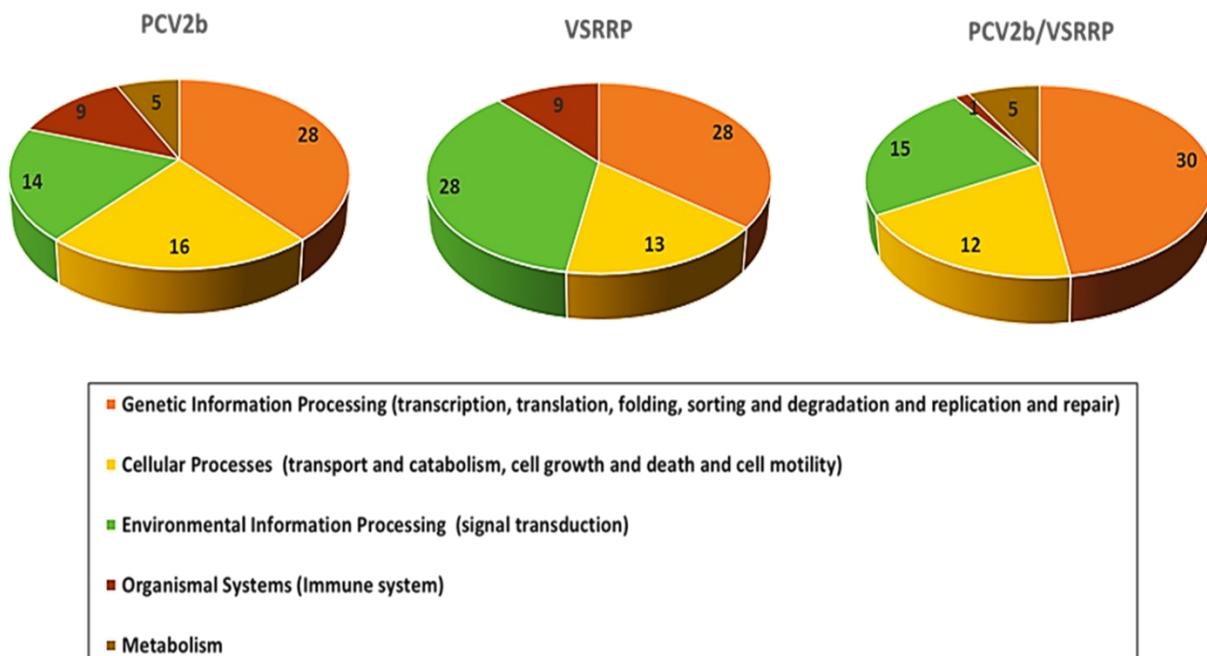


Figure 1. – Pourcentage de gènes différentiellement exprimés (DEGs) impliqués dans différentes systèmes biologiques (selon KEGG), dans les cellules infectées avec PCV2b, VSRRP et PCV2b/VSRRP, comparativement aux cellules non-infectées.

L'analyse d'enrichissement de l'ontologie des gènes (GO) réalisée avec la liste des DEGs identifiés dans les cellules co-infectées PCV2b/VSRRP a montré une surreprésentation des processus cellulaires principalement liés à la traduction cytoplasmique, aux processus métaboliques, aux processus biosynthétiques et à l'expression génique dans ces cellules. Grâce à l'analyse d'enrichissement des voies cellulaires, il a été constaté que la voie cellulaire « ribosome » était significativement enrichie dans les cellules infectées par PCV2b et PCV2b/VSRRP. De plus, l'analyse d'enrichissement des interactions protéine-protéine a révélé que plusieurs DEGs identifiés dans les cellules infectées par PCV2b et PCV2b/VSRRP codaient pour un groupe de protéines ribosomales principalement impliquées dans les processus biologiques et voies cellulaires suivantes : « SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane » et « Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC) ».

« SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane » est le processus qui décrit la translocation cotranslationnelle de protéines vers l'intérieur du réticulum endoplasmique. Les polypeptides ciblés pénètrent dans le réticulum endoplasmique lors de leur synthèse au niveau des ribosomes cytoplasmiques par le canal de translocation intégré dans la membrane du réticulum endoplasmique. Les protéines transloquées sont ensuite repliées et assemblées à l'intérieur du réticulum endoplasmique [746].

La voie « Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC) » est une voie de contrôle de la qualité de l'ARNm qui est conservée parmi les cellules eucaryotes. Elle reconnaît principalement les transcrits avec des codons de terminaison prématurés, des formes d'ARN « inhabituelles », jouant un rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. La voie NMD dégrade également les ARNs viraux ou les transcrits viraux, servant de système immunitaire intrinsèque contre les virus à ARN, principalement les virus à ARN à sens positif. À leur tour, les virus ont développé des stratégies pour contourner ce mécanisme de défense antiviral inné [747].

Le VSRRP, étant un virus à ARN simple brin à sens positif, pourrait être ciblé par la voie NMD, ce qui expliquerait, au moins partiellement, la diminution de la réplication du VSRRP observée dans les cellules co-infectées. Cependant, il n'y a pas de rapport existant sur l'interaction du VSRRP avec la voie NMD, de sorte que cette hypothèse doit être corroborée par la réalisation de nouvelles expériences.

Des analyses de séquençage de l'extrémité 3' des ARNm cellulaires ont également été effectuées au cours de l'étude de la co-infection PCV2b/VIP H1N1 dans les cellules NPTr et iPAM 3D4/21. Dans les cellules NPTr co-infectées, 627 DEGs ont été identifiés, comparativement aux cellules non infectées. L'analyse d'enrichissement des voies cellulaires réalisée avec les DEGs identifiés a montré que les voies cellulaires suivantes : « ECM-receptor interaction », « protein processing in endoplasmic reticulum », « focal adhesion » et « regulation of actin cytoskeleton » étaient parmi les voies les plus enrichies dans les cellules co-infectées ainsi que dans les cellules infectées uniquement par le PCV2b. Les voies cellulaires suivantes étaient également surreprésentées dans les cellules NPTr infectées par le PCV2b/VIP H1N1 : « mRNA surveillance », « HIF-1 signaling

pathway », « spliceosome », « phagosome », « NOD-like receptor signaling pathway » et « influenza A pathway ».

La voie « NOD-like receptor signaling » est impliquée dans la réponse antivirale de l'hôte contre l'infection par les virus de l'influenza [748]. Certains récepteurs de type NOD (NLR) sont associés à la formation de l'inflammasome, un complexe multiprotéique cytosolique qui, une fois activé, induit la production de cytokines et le recrutement de cellules immunitaires au site de l'infection [749, 750]. Le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans la réponse immunitaire protectrice et nuisible pendant l'infection par les virus de l'influenza a largement été étudié [750-753]. Fait intéressant, il a été constaté dans la présente étude que l'ARNm de NLRP3 était surexprimé dans les cellules NPTr co-infectées par le PCV2b et le VIP H1N1, mais pas dans les cellules infectées uniquement par le VIP H1N1 ou le PCV2b. Cela pourrait indiquer une possible implication du complexe inflammasome dans la co-infection avec ces deux virus dans les cellules NPTr infectées.

Dans les cellules iPAM 3D4/21, 164 DEGs ont été identifiés dans les cellules co-infectées PCV2b/VIP H1N1, comparativement aux cellules non infectées. L'analyse de l'enrichissement des voies cellulaires a montré que les voies de signalisation « NF-Kappa B » et « TNF » étaient les voies les plus enrichies dans les cellules iPAM co-infectées, ainsi que dans les cellules infectées uniquement par le PCV2b. D'autres voies cellulaires enrichies dans les cellules co-infectées sont les suivantes : « apoptosis », « influenza A », « HIF-1 signaling pathway » et « MAPK signaling ». L'apoptose est une réponse de l'hôte à l'infection virale induite afin de prévenir la réplication et la propagation virales [754]. Mais les voies de l'apoptose peuvent être modulées par le virus pour son propre bénéfice. L'apoptose peut être supprimée tôt dans l'infection pour assurer la production de virion ou peut être induite à des stades ultérieurs du cycle viral pour assurer la libération des particules virales et leur propagation efficace à d'autres cellules [754]. Certaines études ont montré que la protéine NS1 du virus de l'influenza a des propriétés pro-apoptotiques et anti-apoptotiques [483, 755]. Wurzer et al. (2003), ont constaté que l'activation de la caspase 3 au début de l'apoptose est importante pour une propagation efficace des virus de l'influenza de type A [756].

La voie de signalisation MAPK peut également favoriser ou restreindre la réplication virale [629]. Dans le cas de l'infection par les virus de l'influenza, il a été démontré que les membres de cette voie régulent positivement plusieurs étapes de la réplication de ces virus [629].

La voie de signalisation HIF-1 a été identifiée parmi les voies les plus modulées dans les cellules co-infectées (NPT_r et iPAM 3D4/21), mais pas dans les cellules infectées uniquement par le PCV2b ou le VIP H1N1. Les rapports sur le rôle de HIF-1 concernant les virus de l'influenza semblent contradictoires. Une étude a rapporté que le virus de l'influenza H1N1 active la voie HIF-1 et induit ensuite la glycolyse, ce qui favorise la réplication virale [757]. Cependant, une autre étude a rapporté que la diminution de l'expression de HIF-1 α dans les cellules A549 favorisait la réplication du virus de l'influenza en favorisant l'autophagie dans les cellules [758]. Il serait intéressant de confirmer, par d'autres études, l'implication de la voie de signalisation HIF-1 dans la modulation du VIP en présence du PCV2b dans les différents modèles cellulaires évalués dans cette thèse.

Dans l'ensemble, le séquençage de l'extrémité 3' des ARNm cellulaires a permis d'identifier des DEGs ayant un possible rôle dans la modulation de l'infection virale dans les cellules co-infectées. Les résultats de l'analyse d'enrichissement des voies cellulaires suggèrent que la co-infection par le PCV2b et le VIP a un impact sur les voies cellulaires liées à la fonction physiologique de chaque type de cellules infectée.

6.4 Rôle du gène DUSP1 dans la co-infection PCV2b/VSRRP

Dans la présente étude, il a été confirmé que la réplication du PCV2b est augmentée après une co-infection ultérieure avec le VSRRP dans les cellules NPT_r-CD163. L'un des objectifs de ce projet de doctorat était d'élucider le rôle de l'un des DEGs identifiés dans les cellules co-infectées, sur la modulation de la réplication du PCV2b par le VSRRP. Le gène cellulaire DUSP1 a été identifié parmi les gènes les plus surexprimés lors de la co-infection PCV2b/VSRRP. Conséquemment, l'impact du gène DUSP1 sur la réplication virale lors de la co-infection PCV2b/VSRRP a été caractérisé. DUSP1 est une phosphatase à double spécificité (DUSP) qui déphosphoryle à la fois la tyrosine et les résidus de sérine/thréonine [759]. Les DUSPs interagissent avec et inactivent les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), régulant ainsi plusieurs fonctions cellulaires, y compris les

réponses inflammatoires et immunitaires [759, 760]. DUSP1 a été impliqué dans l'infection de plusieurs virus, comme le virus de la vaccine (VACV) [761], le polyomavirus JC (JCPyV) [762], le virus de l'hépatite C (VHC) [763], le virus respiratoire syncytial humain (VRS) [764], le virus Sendai (SeV) [764] et le virus SARS-CoV-2 [765], provoquant une modulation de l'infection virale.

Dans la présente étude, l'infection mixte par le PCV2b et le VSRRP, ainsi que la mono-infection avec le VSRRP, ont significativement augmenté l'expression de l'ARNm de DUSP1 par rapport à l'infection par le PCV2b dans les cellules NPTr-CD163. Un test d'immunobuvardage de type Western a confirmé que la production de la protéine DUSP1 était significativement augmentée dans les cellules co-infectées par rapport aux cellules infectées uniquement par le PCV2b. La réduction transitoire de l'expression de DUSP1 à l'aide de DsiRNA spécifiques a réduit la réplication du PCV2b dans les cellules co-infectées. Ces résultats suggèrent que DUSP1 pourrait jouer un rôle dans la modulation de la réplication du PCV2b lors de son induction par le VSRRP dans les cellules NPTr-CD163 infectées. Dans ce cadre, DUSP1 pourrait être un candidat intéressant pour le développement de nouveaux produits ou des stratégies antivirales contre le PCV2.

Pour déterminer les possibles interactions entre DUSP1 et les autres DEGs identifiés dans les cellules NPTr-CD163 co-infectées PCV2b/VSRRP, une analyse des interactions des protéines a été réalisée à l'aide de Metascape (<http://metascape.org>) [766]. Cette analyse a mis en évidence que DUSP1 interagit physiquement avec les protéines ribosomales RPL24, RPL38 et SSR4 (TRAP δ), les deux dernières protéines sont impliquées dans la machinerie de translocation du réticulum endoplasmique. La protéine SSR4 (TRAP δ) fait partie du complexe protéique associé au translocon (TRAP) (Figure 2). Le complexe TRAP interagit avec le canal conducteur formé par la protéine Sec61 ainsi qu'avec la protéine ribosomique L38 (RPL38) [767-769].

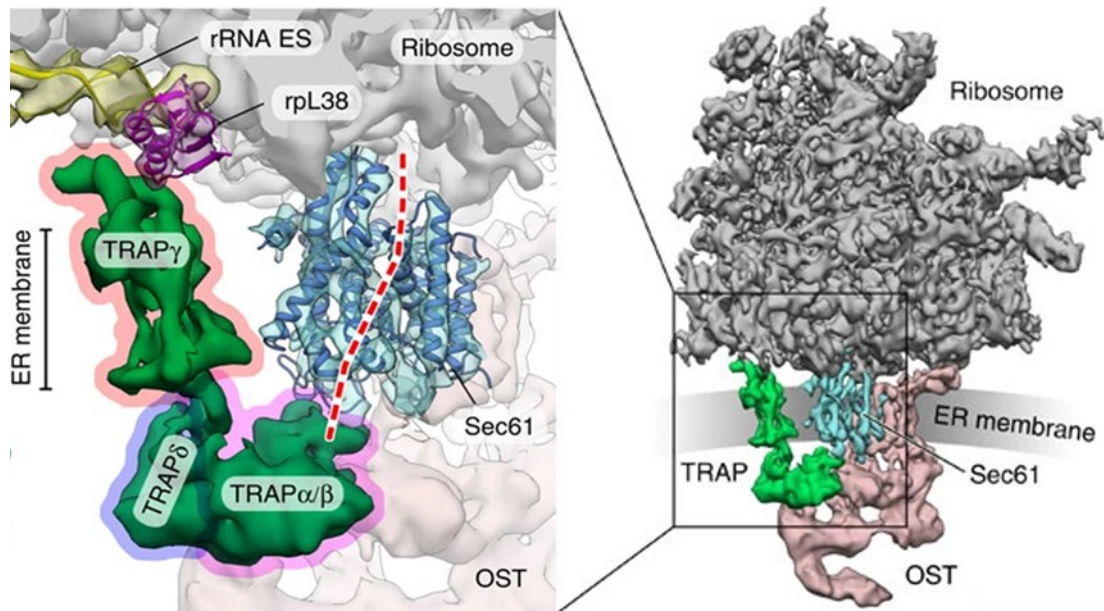


Figure 2. – Positions approximatives des sous-unités de TRAP et association du translocon avec le ribosome. Tiré de [770] avec modification. © Creative Commons.

Il a été rapporté que le complexe TRAP/ribosome favorise l'ouverture du canal Sec61 et donc l'insertion de polypeptides à travers Sec61 vers le réticulum endoplasmique [771]. Le diamètre des pores du complexe Sec61 est plus grand quand il est lié au ribosome, ce qui permet une fuite de Ca^{2+} vers le cytoplasme [772, 773]. L'instabilité du complexe translocon Sec61 a un impact sur l'homéostasie du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique et peut déclencher le phénomène du « stress du réticulum endoplasmique ». Dans ces conditions de stress du réticulum endoplasmique, un réseau de voies de signalisation appelé la réponse aux protéines non repliées (UPR pour *unfolded protein response*) est activé pour restaurer l'homéostasie du réticulum endoplasmique [774]. Cependant, si les conditions de stress persistent, l'UPR déclenche l'apoptose de la cellule [775, 776].

Comme mentionné précédemment, selon l'analyse *in silico* des interactions protéine-protéine réalisée dans cette étude, DUSP1 interagit physiquement avec la protéine ribosomique RLP38 et la sous-unité SSR4 de TRAP, ces deux protéines sont impliquées dans le complexe translocon. Les résultats de la présente thèse de doctorat ne permettent pas de déterminer si la liaison de DUSP1 à RPL38 et SSR4 (TRAP δ) pourrait avoir un impact sur la stabilité du complexe ribosome-translocon, la dynamique de la translocation des protéines ou la fuite de Ca^{2+} du réticulum

endoplasmique. D'autres études sont nécessaires pour déterminer si la surexpression de DUSP1 conduirait au stress du réticulum endoplasmique, l'UPR et l'apoptose dans les cellules.

Fait intéressant, il a été rapporté que le PCV2 déclenche le stress du réticulum endoplasmique et l'UPR dans les cellules PK-15 et les macrophages alvéolaires porcins (PAM) [658, 660, 777], ce qui conduit à l'apoptose et facilite à son tour la réplication virale [129]. Certaines études ont montré que l'induction du stress du réticulum endoplasmique et de la réponse UPR par le PCV2 implique une élévation du calcium dans le cytoplasme, ce qui provoque une altération de l'homéostasie du Ca^{2+} conduisant à l'apoptose [660, 777]. La modulation de l'apoptose par le PCV2 est une stratégie de ce virus pour favoriser la réplication virale ainsi que la libération et la dissémination des virions [778].

Il est important de mentionner que l'expression de DUSP1 peut conduire à une modulation de l'apoptose dans différents types de cellules [779, 780]. Robitaille *et al.* (2017), ont démontré que DUSP1 pourrait induire l'activation d'une voie pro-apoptotique de façon indépendante de JNK/p38 durant l'infection par les paramyxovirus et que l'inhibition de DUSP1 induit une diminution de l'apoptose pendant l'infection par SeV [764]. Cependant, les auteurs n'ont pas identifié la voie de signalisation par laquelle DUSP1 induirait l'apoptose.

Les interactions mises en évidence entre DUSP1 et le complexe ribosome-translocon, ayant un impact potentiel sur l'apoptose, ainsi que l'implication de l'apoptose dans la réplication du PCV2b, suggèrent que le rôle de DUSP1 dans la co-infection PCV2b/VSRRP pourrait impliquer la modulation des voies d'apoptose dans les cellules co-infectées. D'autres études seront nécessaires pour corroborer cette hypothèse et pour comprendre pleinement le rôle de DUSP1 dans la pathogenèse de la co- infection PCV2b/VSRRP et dans la réplication du PCV2b.

6.5 Limites et perspectives

Les infections mixtes avec de multiples agents pathogènes sont plus fréquentes sur le terrain et plus souvent associées au développement de la maladie chez les animaux que les infections par un seul pathogène [1, 4, 46, 47]. L'étude de la pathogenèse virale dans un contexte de co-infections permet une compréhension des interactions virus-hôte dans des conditions plus réalistes. Dans le cadre de ce projet de thèse, les effets des co-infections virales ont été étudiés dans les cellules NPTr-CD163 dans le cas de la co-infection PCV2b/VSRRP et dans les cellules NPTr et iPAM 3D4/21 dans le cas de la co-infection PCV2b/VIP. Ces modèles cellulaires ont été choisis en tenant compte des cellules ciblées par ces virus *in vivo*. Bien que les résultats de cette étude permettent de mieux comprendre les interactions entre les virus PCV2b, VSRRP et VIP entre eux et avec les cellules épithéliales du tractus respiratoire et les PAM, l'étude présente certaines limites.

La communication entre les cellules épithéliales alvéolaires résidentes et les macrophages alvéolaires joue un rôle essentiel dans les réponses immunitaires de l'hôte contre les pathogènes respiratoires [781, 782]. Les expériences de co-infections virales dans ce projet de thèse ont été réalisées dans des conditions qui ne prennent pas en compte ces interactions intercellulaires cellules épithéliales ↔ macrophages. L'utilisation d'un modèle de co-culture de macrophages alvéolaires et de cellules épithéliales de la trachée de porc pourrait être une stratégie intéressante à utiliser lors de futures études de co-infections virales [783]. De même, des modèles *ex vivo*, comme les tranches de poumon découpées avec précision (PCLS), constituent des plate-formes très utiles pour étudier les réponses inflammatoires et immunitaires lors d'infections virales [784, 785]. Contrairement à la culture cellulaire monocouche, les PCLS conservent l'architecture anatomique de l'organe, avec les cellules dans leur configuration de matrice tissulaire d'origine, et d'autres caractéristiques spécifiques à l'organe, telles que l'activité métabolique, l'homéostasie tissulaire et certaines fonctions immunologiques [786].

Les résultats de l'analyse de séquençage des ARNm cellulaires effectuée lors de ce projet ont mis en évidence des gènes et des voies cellulaires significativement impactés au cours des infections et co-infections par le PCV2b, VSRRP et VIP. Néanmoins, il faut remarquer que lorsque des

expériences d'infections virales sont menées en laboratoire, la population cellulaire résultante est souvent composée de cellules infectées et non infectées, car 100 % des cellules de la population ne seraient pas nécessairement infectées par le virus. Dans la présente étude, la population de cellules co-infectées était composée de cellules infectées par un seul virus, de cellules doublement infectées et de cellules non infectées. Par conséquent, les résultats obtenus de l'analyse de séquençage des ARNm représentent une moyenne sur une population hétérogène de cellules co-infectées et ne reflètent pas pleinement la complexité des interactions entre les différents virus infectant la même cellule en même temps. Le séquençage des ARNm sur des cellules uniques (scRNA-seq pour single-cell RNA-sequencing) serait une meilleure stratégie pour l'étude du transcriptome au niveau des cellules individuelles dans un contexte de co-infection virale. Cette approche unicellulaire permettrait de mieux comprendre les réponses des cellules hôtes qui subissent une infection virale directe à la place d'évaluer une population cellulaire hétérogène qui contient également l'activation des cellules « bystander » [787].

La sensibilité et la précision des analyses des données de séquençage d'ARN dépendent du nombre de lectures obtenu à partir de chaque échantillon. Un certain nombre de lectures sont nécessaires pour assurer une couverture suffisante du transcriptome, permettant la détection de transcrits à faible abondance [788]. Le faible nombre de DEGs identifiés dans les cellules infectées uniquement par le VSRRP a limité l'analyse de l'impact réel de l'infection par ce virus dans les cellules NPTr-CD163. Il faut mentionner que lors des études transcriptomiques de la co-infection PCV2b/VSRRP, la construction des libraires de séquençage a été réalisée avec un nouveau kit disponible sur le marché, le QIAseq UPX 3' Transcriptome Kit (Qiagen). Ce kit et son protocole d'analyse des données permettaient la construction de libraires et l'analyse de l'expression génique à partir d'ARN purifié (10 pg - 10 ng), de lysats cellulaires (jusqu'à 1000 cellules) et de cellules individuelles. Ce kit présente les avantages d'utiliser un indice moléculaire unique (UMI : unique molecular index) pour marquer chaque molécule d'ARN dans les échantillons et un ID d'échantillon unique lors de la transcription inverse. Cela permet que tous les ADNc marqués individuellement dans tous les échantillons (jusqu'à 96 ou 384 échantillons) peuvent être combinés, ce qui permet d'effectuer toutes les étapes ultérieures de construction de la librairie dans un seul tube (<https://www.qiagen.com>). Cependant, en combinant seulement 8 ou 24

échantillons de notre étude, il n'a pas été possible d'obtenir le nombre de lectures attendu après le séquençage des libraires construites, ce qui aurait pu affecter nos résultats lors de l'analyse de données. Des moyens efficaces pour améliorer la détection des DEGs, en particulier des gènes faiblement exprimés lors des études transcriptomiques de la co-infection PCV2b/VSRRP, serait une meilleure optimisation de la méthode de préparation des libraires ou l'ajout d'une quantité plus élevée de réplicats biologiques lors de la réalisation des expériences [788].

Au cours des analyses transcriptomiques, le gène cellulaire DUSP1 a été identifié parmi les DEGs ayant une expression significativement augmentée dans les cellules co-infectées PCV2b/VSRRP par rapport aux cellules infectées uniquement par le PCV2b. Le rôle possible de DUSP1 dans la modulation du PCV2b pendant la co-infection avec le VSRRP a été mis en évidence lors des expériences d'interférences réalisées avec des DsiRNA spécifiques au DUSP1. Cependant, la technologie des ARN interférents possède certaines limitations. Un grand nombre d'ARN double brin introduit dans la cellule peut mener à l'activation de voies de signalisation de l'immunité innée, incluant la voie des ISGs [789, 790]. L'utilisation de contrôles négatifs de transfection, c'est-à-dire, un DsiRNA non ciblant le gène d'intérêt et qui n'interagira pas avec aucune séquence du transcriptome de la cellule hôte, prévient l'apparition de fausses conclusions basées sur les effets non-spécifiques qu'entraîne la présence d'ARN interférents dans la cellule. Même si dans la présente étude, un contrôle négatif de transfection de type « *scrambled* » a été utilisé, il serait pertinent de confirmer le rôle de DUSP1 dans les cellules co-infectées par d'autres techniques comme l'édition CRISPR/Cas9. Par ailleurs, des expériences de surexpression de DUSP1 à l'aide d'un plasmide d'expression pourraient aussi confirmer le rôle de DUSP1 dans la réplication du PCV2b.

Finalement, il a été rapporté que l'infection par le VIP diminuerait la réponse immunitaire protectrice d'un vaccin sous-unitaire contre le PCV2 [43]. Une autre étude a rapporté que la vaccination contre le VSRRP, suivi d'une infection avec le PCV2, augmentait la virémie du PCV2, les lésions induites par le PCV2 et les antigènes du PCV2 au niveau des lésions histopathologiques chez les porcs co-infectés [791]. Compte tenu de ces rapports, il serait intéressant d'évaluer la pathogénèse virale lors de co-infections par des souches vaccinales de PCV2, VSRRP ou VIP.

Chapitre 7 - Conclusions générales

Le PCV2b, le VSRRP et le VIP sont des agents pathogènes importants impliqués dans le CRP. L'objectif général de ce projet de thèse était d'étudier la pathogenèse de la co-infection du PCV2b avec le VSRRP ou le VIP *in vitro* et d'élucider les mécanismes moléculaires qu'y pourraient être impliqués. Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'utilité des cellules NPTr-CD163 comme modèle *in vitro* de cellules épithéliales respiratoires pour étudier l'impact de la co-infection PCV2b/VSRRP. De plus, les effets de la co-infection PCV2b/VIP ont été mis en évidence et comparés entre différents types de cellules porcines, soit les cellules épithéliales du tractus respiratoire (cellules NPTr) et les macrophages alvéolaires (cellules iPAM 3D4/21). Il a été confirmé que dans les cellules préalablement infectées par le PCV2b, une infection subséquente par le VSRRP peut favoriser la réplication du PCV2b. Également, il a été démontré que PCV2b module la réplication de VIP en fonction du type de cellule infectée, bien que la réplication de PCV2b ne soit pas affectée par une surinfection avec le VIP. L'analyse des réponses cellulaires lors de ces co-infections a montré que l'expression transcriptionnelle des cytokines inflammatoires et des IFNs dans les cellules co-infectées est modulée par rapport à l'infection par un seul virus. Cela pourrait avoir un impact sur l'inflammation et les réponses immunitaires innées chez les animaux co-infectés. Cette étude a aussi mis en évidence que les réponses de l'hôte (inflammatoire et antivirale) face à la co-infection PCV2b/VIP pourraient dépendre du sous-type du VIP et du type de cellule infectée. De plus, les DEGs identifiés durant les co-infections virales pourraient être des candidats potentiels pour le développement de nouvelles stratégies antivirales. Dans ce contexte, la modulation du gène cellulaire DUSP1 pourrait être une stratégie prometteuse dans la lutte contre les infections virales porcines. Dans l'ensemble, les résultats de la présente étude ont contribué à une meilleure compréhension de l'impact et des mécanismes moléculaires associés à la pathogenèse des co-infections PCV2b/VSRRP et PCV2b/VIP. Les connaissances apportées par ce projet de recherche de doctorat confirment la nécessité de réaliser une approche diagnostic multi-pathogènes avant de mettre en place des stratégies de prévention et de contrôle dans le cadre du complexe respiratoire porcin.

Références bibliographiques

1. Brockmeier, S.L., Halbur, P.G., and Thacker, E.L., *Porcine respiratory disease complex*. Wiley Online Library. Hoboken, NJ, USA, 2002: p. 231-258.
2. Choi, Y.K., Goyal, S.M., and Joo, H.S., *Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs*. The Canadian veterinary journal, 2003. **44**(9): p. 735.
3. Kim, K.S., Jung, J.Y., Kim, J.H., Kang, S.C., Hwang, E.K., Park, B.K., Kim, D.Y., and Kim, J.H., *Epidemiological characteristics of pulmonary pneumocystosis and concurrent infections in pigs in Jeju Island, Korea*. J Vet Sci, 2011. **12**(1): p. 15-9.
4. Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L., and Halbur, P., *Polymicrobial respiratory disease in pigs*. Animal Health Research Reviews, 2011. **12**(2): p. 133-148.
5. Shi, K., Li, H., Guo, X., Ge, X., Jia, H., Zheng, S., and Yang, H., *Changes in peripheral blood leukocyte subpopulations in piglets co-infected experimentally with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2*. Vet Microbiol, 2008. **129**(3-4): p. 367-77.
6. Park, C., Seo, H.W., Park, S.J., Han, K., and Chae, C., *Comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated lesions produced by co-infection between two genotypes of PCV2 and two genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 11): p. 2486-2494.
7. Fan, P., Wei, Y., Guo, L., Wu, H., Huang, L., Liu, J., and Liu, C., *Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2*. Virol J, 2013. **10**: p. 265.
8. Opriessnig, T., Gauger, P.C., Faaberg, K.S., Shen, H., Beach, N.M., Meng, X.J., Wang, C., and Halbur, P.G., *Effect of porcine circovirus type 2a or 2b on infection kinetics and pathogenicity of two genetically divergent strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the conventional pig model*. Vet Microbiol, 2012. **158**(1-2): p. 69-81.
9. Sinha, A., Shen, H.G., Schalk, S., Beach, N.M., Huang, Y.W., Meng, X.J., Halbur, P.G., and Opriessnig, T., *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, 2011. **152**(3-4): p. 235-46.
10. Wei, H., Lenz, S.D., Van Alstine, W.G., Stevenson, G.W., Langohr, I.M., and Pogranichniy, R.M., *Infection of cesarean-derived colostrum-deprived pigs with porcine circovirus type 2 and Swine influenza virus*. Comp Med, 2010. **60**(1): p. 45-50.
11. Gagnon, C.A., Tremblay, D., Tijssen, P., Venne, M.H., Houde, A., and Elahi, S.M., *The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada*. Can Vet J, 2007. **48**(8): p. 811-9.
12. Kim, J., Chung, H.K., and Chae, C., *Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex*. Vet J, 2003. **166**(3): p. 251-6.
13. Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X., Pelzer, K., and Buechner-Maxwell, V., *Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease*. Journal of veterinary internal medicine, 2009. **23**(6): p. 1151-1163.

14. *Analysis of the economic and animal production impact of Porcine Circovirus Associated Disease (PCVAD) on the Canadian and North American pork industries.* eBiz Professionals Inc. Présenté au Conseil canadien de la santé porcine, 2010.
15. Saikumar, G. and Das, T., *Porcine circovirus.* Recent Advances in Animal Virology, 2019: p. 171-195.
16. Opriessnig, T. and Halbur, P.G., *Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease.* Virus Res, 2012. **164**(1-2): p. 20-32.
17. Pallares, F.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., Sorden, S.D., Villar, D., Janke, B.H., Yaeger, M.J., Larson, D.J., Schwartz, K.J., Yoon, K.J., and Hoffman, L.J., *Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).* J Vet Diagn Invest, 2002. **14**(6): p. 515-9.
18. Ouyang, T., Zhang, X., Liu, X., and Ren, L., *Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses.* Viruses, 2019. **11**(2).
19. Segales, J., Calsamiglia, M., Rosell, C., Soler, M., Maldonado, J., Martin, M., and Domingo, M., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain.* Vet Microbiol, 2002. **85**(1): p. 23-30.
20. Sorden, S., Harms, P., Sirinarumitr, T., Morozov, I., Halbur, P., Yoon, K., and Paul, P., *Porcine circovirus and PRRSV co-infection in pigs with chronic bronchointerstitial pneumonia and lymphoid depletion: an emerging syndrome in midwestern swine.* Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Minneapolis, Minn, 1998: p. 75.
21. Wellenberg, G.J., Stockhofe-Zurwieden, N., Boersma, W.J., De Jong, M.F., and Elbers, A.R., *The presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: a case-control study.* Res Vet Sci, 2004. **77**(2): p. 177-84.
22. Pesch, S., Schmidt, U., and Ohlinger, V. *Proliferative necrotizing pneumonia (PNP) is a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2).* in *Proceedings of the 16th International Congress on Pigs Veterinary Society.* 2000.
23. Dorr, P.M., Baker, R.B., Almond, G.W., Wayne, S.R., and Gebreyes, W.A., *Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine.* J Am Vet Med Assoc, 2007. **230**(2): p. 244-50.
24. Jimenez, L.F., Ramirez Nieto, G., Alfonso, V.V., and Correa, J.J., *Association of swine influenza H1N1 pandemic virus (SIV-H1N1p) with porcine respiratory disease complex in sows from commercial pig farms in Colombia.* Virol Sin, 2014. **29**(4): p. 242-9.
25. Lunney, J.K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., and Renukaradhya, G.J., *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System.* Annu Rev Anim Biosci, 2016. **4**: p. 129-54.
26. Magar, R., Larochelle, R., Carman, S., and Thomson, G., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus identification in proliferative and necrotizing pneumonia cases from Ontario.* Can Vet J, 1994. **35**(8): p. 523-4.

27. Lunney, J.K., Benfield, D.A., and 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**(1-2): p. 1-6.
28. *Programme de surveillance des maladies endémiques porcines (0404)*. Réseau d'alerte et d'information zoosanitaire (RAIZO), 2021.
29. Ma, W., *Swine influenza virus: Current status and challenge*. Virus research, 2020. **288**: p. 198118.
30. Salvesen, H.A. and Whitelaw, C.B.A., *Current and prospective control strategies of influenza A virus in swine*. Porcine Health Management, 2021. **7**(1): p. 1-17.
31. Fraile, L., Calsamiglia, M., Mateu, E., Espinal, A., Cuxart, A., Seminati, C., Martin, M., Domingo, M., and Segales, J., *Prevalence of infection with porcine circovirus-2 (PCV-2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in an integrated swine production system experiencing postweaning multisystemic wasting syndrome*. Can J Vet Res, 2009. **73**(4): p. 308-12.
32. Misinzo, G., Meerts, P., Bublot, M., Mast, J., Weingartl, H.M., and Nauwynck, H.J., *Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 7): p. 2057-2068.
33. Sanchez, R.E., Jr., Meerts, P., Nauwynck, H.J., and Pensaert, M.B., *Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life*. Vet Microbiol, 2003. **95**(1-2): p. 15-25.
34. Wu, N.-H., Yang, W., Beineke, A., Dijkman, R., Matrosovich, M., Baumgärtner, W., Thiel, V., Valentin-Weigand, P., Meng, F., and Herrler, G., *The differentiated airway epithelium infected by influenza viruses maintains the barrier function despite a dramatic loss of ciliated cells*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-12.
35. Nicol, M.Q. and Dutia, B.M., *The role of macrophages in influenza A virus infection*. Future Virology, 2014. **9**(9): p. 847-862.
36. Yu, W.C., Chan, R.W., Wang, J., Travanty, E.A., Nicholls, J.M., Peiris, J.M., Mason, R.J., and Chan, M.C., *Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses*. Journal of virology, 2011. **85**(14): p. 6844-6855.
37. Delgado-Ortega, M., Melo, S., Punyadarsaniya, D., Ramé, C., Olivier, M., Soubieux, D., Marc, D., Simon, G., Herrler, G., and Berri, M., *Innate immune response to a H3N2 subtype swine influenza virus in newborn porcine trachea cells, alveolar macrophages, and precision-cut lung slices*. Veterinary research, 2014. **45**: p. 1-18.
38. Milek, D., Wozniak, A., Podgorska, K., and Stadejek, T., *Do porcine parvoviruses 1 through 7 (PPV1-PPV7) have an impact on porcine circovirus type 2 (PCV2) viremia in pigs?* Vet Microbiol, 2020. **242**: p. 108613.
39. Hu, Y., Zhan, Y., Wang, D., Xie, X., Liu, T., Liu, W., Wang, N., Deng, Z., Lei, H., Yang, Y., and Wang, A., *Evidence of natural co-infection with PCV2b subtypes in vivo*. Arch Virol, 2017. **162**(7): p. 2015-2020.
40. Salines, M., Andraud, M., Pellerin, M., Bernard, C., Grasland, B., Pavio, N., and Rose, N., *Impact of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on hepatitis E virus (HEV) infection and transmission under experimental conditions*. Vet Microbiol, 2019. **234**: p. 1-7.

41. Tomas, A., Fernandes, L.T., Valero, O., and Segales, J., *A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2)*. Vet Microbiol, 2008. **132**(3-4): p. 260-73.
42. de Menezes Cruz, A.C., Silveira, R.L., Baez, C.F., Varella, R.B., and de Castro, T.X., *Clinical aspects and weight gain reduction in swine infected with porcine circovirus type 2 and torque teno sus virus in Brazil*. Vet Microbiol, 2016. **195**: p. 154-157.
43. Sun, Y., Zhang, J., Liu, Z., Zhang, Y., and Huang, K., *Swine influenza virus infection decreases the protective immune responses of subunit vaccine against porcine circovirus type 2*. Frontiers in Microbiology, 2021. **12**: p. 4068.
44. Eclercy, J., Larcher, T., Andraud, M., Renson, P., Bernard, C., Bigault, L., Ledevin, M., Paboeuf, F., Grasland, B., Rose, N., and Bourry, O., *PCV2 co-infection does not impact PRRSV MLV1 safety but enhances virulence of a PRRSV MLV1-like strain in infected SPF pigs*. Vet Microbiol, 2020. **244**: p. 108656.
45. Niederwerder, M.C., Bawa, B., Seroo, N.V., Tribble, B.R., Kerrigan, M.A., Lunney, J.K., Dekkers, J.C., and Rowland, R.R., *Vaccination with a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Modified Live Virus Vaccine Followed by Challenge with PRRS Virus and Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Protects against PRRS but Enhances PCV2 Replication and Pathogenesis Compared to Results for Nonvaccinated Cochallenged Controls*. Clin Vaccine Immunol, 2015. **22**(12): p. 1244-54.
46. Halbur, P., *Changing trends in the porcine respiratory disease complex*. Proc. Nacional Producers Council Pork Summit, Des Moines, IA, 1996.
47. Fablet, C., Marois-Crehan, C., Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., Kobisch, M., Madec, F., and Rose, N., *Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: a cross-sectional study*. Vet Microbiol, 2012. **157**(1-2): p. 152-63.
48. Qin, S., Ruan, W., Yue, H., Tang, C., Zhou, K., and Zhang, B., *Viral communities associated with porcine respiratory disease complex in intensive commercial farms in Sichuan province, China*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 13341.
49. Zhu, H., Chang, X., Zhou, J., Wang, D., Zhou, J., Fan, B., Ni, Y., Yin, J., Lv, L., and Zhao, Y., *Co-infection analysis of bacterial and viral respiratory pathogens from clinically healthy swine in Eastern China*. Veterinary Medicine Science, 2021. **7**(5): p. 1815-1819.
50. 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., and Meurens, F., *Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract*. Vet Res, 2020. **51**(1): p. 80.
51. Tsai, Y.C., Chang, H.W., Jeng, C.R., Lin, T.L., Lin, C.M., Wan, C.H., and Pang, V.F., *The effect of infection order of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on dually infected swine alveolar macrophages*. BMC Vet Res, 2012. **8**: p. 174.
52. Wang, Y., Gagnon, C.A., Savard, C., Music, N., Srednik, M., Segura, M., Lachance, C., Bellehumeur, C., and Gottschalk, M., *Capsular sialic acid of Streptococcus suis serotype 2 binds to swine influenza virus and enhances bacterial interactions with virus-infected tracheal epithelial cells*. Infection immunity, 2013. **81**(12): p. 4498-4508.
53. Dang, Y., Lachance, C., Wang, Y., Gagnon, C.A., Savard, C., Segura, M., Grenier, D., and Gottschalk, M., *Transcriptional approach to study porcine tracheal epithelial cells*

- individually or dually infected with swine influenza virus and Streptococcus suis*. BMC veterinary research, 2014. **10**(1): p. 1-11.
54. Renukaradhya, G.J., Alekseev, K., Jung, K., Fang, Y., and Saif, L.J., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced immunosuppression exacerbates the inflammatory response to porcine respiratory coronavirus in pigs*. Viral Immunol, 2010. **23**(5): p. 457-66.
 55. Shi, K.C., Guo, X., Ge, X.N., Liu, Q., and Yang, H.C., *Cytokine mRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from piglets experimentally co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2*. Vet Microbiol, 2010. **140**(1-2): p. 155-60.
 56. Thanawongnuwech, R., Thacker, B., Halbur, P., and Thacker, E.L., *Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Mycoplasma hyopneumoniae*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(5): p. 901-8.
 57. Czyzewska-Dors, E., Pomorska-Mol, M., Dors, A., Pluta, A., Podgorska, K., Kwit, K., Stasiak, E., and Lukomska, 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**(4): p. 489-495.
 58. Zhang, W., Fu, Z., Yin, H., Han, Q., Fan, W., Wang, F., and Shang, Y., *Macrophage polarization modulated by porcine circovirus type 2 facilitates bacterial coinfection*. Frontiers in Immunology, 2021. **12**: p. 688294.
 59. Liu, X., Chen, L., Song, Q., Yang, F., Li, Y., Zuo, Y., Jiao, J., and Wang, X., *[Coinfection effects of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in vivo on phagocytosis and interferon mRNA expression of porcine alveolar macrophages]*. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2011. **51**(1): p. 105-14.
 60. Kavanova, L., Matiaskova, K., Leva, L., Nedbalcova, K., Matiasovic, J., Faldyna, M., and Salat, J., *Concurrent infection of monocyte-derived macrophages with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Haemophilus parasuis: A role of IFNalpha in pathogenesis of co-infections*. Vet Microbiol, 2018. **225**: p. 64-71.
 61. Kavanova, L., Matiaskova, K., Leva, L., Stepanova, H., Nedbalcova, K., Matiasovic, J., Faldyna, M., and Salat, J., *Concurrent infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Haemophilus parasuis in two types of porcine macrophages: apoptosis, production of ROS and formation of multinucleated giant cells*. Vet Res, 2017. **48**(1): p. 28.
 62. Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., and Griem, W., *Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus*. Arch Virol, 1986. **91**(3-4): p. 271-6.
 63. Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., Reilly, G.A., Adair, B., Ellis, W.A., and McNulty, M.S., *Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material*. Vet Microbiol, 1995. **44**(1): p. 49-64.
 64. Allan, G.M. and Ellis, J.A., *Porcine circoviruses: a review*. J Vet Diagn Invest, 2000. **12**(1): p. 3-14.
 65. Harding, J. *Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation*. in Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 1997.

66. Clark, E. *Post-weaning multisystemic wasting syndrome*. in *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 1997.
67. Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., and Adair, B.M., *Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe*. *J Vet Diagn Invest*, 1998. **10**(1): p. 3-10.
68. Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., and Haines, D., *Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome*. *Can Vet J*, 1998. **39**(1): p. 44-51.
69. Le Cann, P., Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., and Jestin, A., *Piglet wasting disease*. *Veterinary Record*, 1997. **141**: p. 660.
70. Segales, J., Sitjar, M., Domingo, M., Dee, S., Pozo, M.d., Noval, R., Sacristan, C., Heras, A., Ferro, A., and Latimer, K., *First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain*. *Veterinary Record*, 1997. **141**(23): p. 600-601.
71. Allan, G., Meehan, B., Todd, D., Kennedy, S., McNeilly, F., Ellis, J., Clark, E.G., Harding, J., Espuna, E., Botner, A., and Charreyre, C., *Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes*. *Vet Rec*, 1998. **142**(17): p. 467-8.
72. Sanchez, R., Nauwynch, G., Pensaert, M., *Proceedings of the International Conference of ssDNA Viruses, Plants, Birds, Pigs, and Primates, St Malo, France, 2001*: p. 122.
73. Grierson, S.S., King, D.P., Sandvik, T., Hicks, D., Spencer, Y., Drew, T.W., and Banks, M., *Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK*. *Arch Virol*, 2004. **149**(6): p. 1171-83.
74. Walker, I.W., Konoby, C.A., Jewhurst, V.A., McNair, I., McNeilly, F., Meehan, B.M., Cottrell, T.S., Ellis, J.A., and Allan, G.M., *Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2*. *J Vet Diagn Invest*, 2000. **12**(5): p. 400-5.
75. Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K., and Buechner-Maxwell, V., *Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease*. *J Vet Intern Med*, 2009. **23**(6): p. 1151-63.
76. Magar, R., Muller, P., and Larochele, R., *Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2*. *Can J Vet Res*, 2000. **64**(3): p. 184-6.
77. Rodriguez-Arriola, G.M., Segales, J., Domingo, M., and Plana-Duran, J., *Lack of PCV-2 infection in non-porcine species in Spain*. *Vet Rec*, 2003. **153**(12): p. 371-2.
78. Mori, M., Sato, K., Akachi, S., Asahi, S., Taniguchi, S., and Narita, M., *Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989*. *Vet Pathol*, 2000. **37**(6): p. 667-9.
79. Segales, J., Allan, G.M., and Domingo, M., *Porcine circovirus diseases*. *Anim Health Res Rev*, 2005. **6**(2): p. 119-42.
80. Segales, J., Calsamiglia, M., Olvera, A., Sibila, M., Badiella, L., and Domingo, M., *Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)*. *Vet Microbiol*, 2005. **111**(3-4): p. 223-9.
81. D'Allaire, S., Moore, C., and Cote, G., *A survey on finishing pig mortality associated with porcine circovirus diseases in Quebec*. *Can Vet J*, 2007. **48**(2): p. 145-6.

82. Gagnon, C.A., Music, N., Fontaine, G., Tremblay, D., and Harel, J., *Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant*. *Vet Microbiol*, 2010. **144**(1-2): p. 18-23.
83. Lefkowitz, E., Dempsey, D., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G., and Smith, D.B., *Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. *Nucleic Acids Research*, 2017. **46**(D1): p. D708–D717.
84. Fenaux, M., Halbur, P.G., Gill, M., Toth, T.E., and Meng, X.J., *Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2*. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(7): p. 2494-503.
85. Palinski, R., Pineyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., Byers, E., and Hause, B.M., *A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure*. *J Virol*, 2017. **91**(1).
86. Phan, T.G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T.P., Li, L., Deng, X., Resende, T., Vannucci, F., and Delwart, E., *Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation*. *Viol J*, 2016. **13**(1): p. 184.
87. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Dotto, G., Gigli, A., Ceglie, L., and Drigo, M., *International trades, local spread and viral evolution: the case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy*. *Infect Genet Evol*, 2015. **32**: p. 409-15.
88. Saraiva, G.L., Vidigal, P.M.P., Assao, V.S., Fajardo, M.L.M., Loreto, A.N.S., Fietto, J.L.R., Bressan, G.C., Lobato, Z.I.P., Almeida, M.R., and Silva-Junior, A., *Retrospective Detection and Genetic Characterization of Porcine circovirus 3 (PCV3) Strains Identified between 2006 and 2007 in Brazil*. *Viruses*, 2019. **11**(3).
89. Stadejek, T., Wozniak, A., Milek, D., and Biernacka, K., *First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland*. *Transbound Emerg Dis*, 2017. **64**(5): p. 1350-1353.
90. Wei, C., Lin, Z., Dai, A., Chen, H., Ma, Y., Li, N., Wu, Y., Yang, X., Luo, M., and Liu, J., *Emergence of a novel recombinant porcine circovirus type 2 in China: PCV2c and PCV2d recombinant*. *Transbound Emerg Dis*, 2019. **66**(6): p. 2496-2506.
91. Muhling, J., Raye, W.S., Buddle, J.R., and Wilcox, G.E., *Genetic characterisation of Australian strains of porcine circovirus types 1 and 2*. *Aust Vet J*, 2006. **84**(12): p. 421-5; discussion 416.
92. Afolabi, K.O., Iweriebor, B.C., Okoh, A.I., and Obi, L.C., *Global Status of Porcine circovirus Type 2 and Its Associated Diseases in Sub-Saharan Africa*. *Adv Virol*, 2017. **2017**: p. 6807964.
93. Garkavenko, O., Elliott, R.B., and Croxson, M.C., *Identification of pig circovirus type 2 in New Zealand pigs*. *Transplant Proc*, 2005. **37**(1): p. 506-9.
94. Cao, L., Sun, W., Lu, H., Tian, M., Xie, C., Zhao, G., Han, J., Wang, W., Zheng, M., Du, R., Jin, N., and Qian, A., *Genetic variation analysis of PCV1 strains isolated from Guangxi Province of China in 2015*. *BMC Vet Res*, 2018. **14**(1): p. 43.

95. Nguyen, V.G., Do, H.Q., Huynh, T.M.L., Park, Y.H., Park, B.K., and Chung, H.C., *Molecular-based detection, genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus 4 from Korean domestic swine farms*. *Transboundary Emerging Diseases*, 2022. **69**(2): p. 538-548.
96. Sun, W., Du, Q., Han, Z., Bi, J., Lan, T., Wang, W., and Zheng, M., *Detection and genetic characterization of porcine circovirus 4 (PCV4) in Guangxi, China*. *Gene*, 2021. **773**: p. 145384.
97. Hou, C.Y., Zhang, L.H., Zhang, Y.H., Cui, J.T., Zhao, L., Zheng, L.L., and Chen, H.Y., *Phylogenetic analysis of porcine circovirus 4 in Henan Province of China: A retrospective study from 2011 to 2021*. *Transbound Emerg Dis*, 2021.
98. Zhang, H.H., Hu, W.Q., Li, J.Y., Liu, T.N., Zhou, J.Y., Opriessnig, T., and Xiao, C.T., *Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China*. *Transbound Emerg Dis*, 2020. **67**(3): p. 1057-1061.
99. Franzo, G. and Segales, J., *Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology*. *PLoS One*, 2018. **13**(12): p. e0208585.
100. Xiao, C.T., Halbur, P.G., and Opriessnig, T., *Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d*. *J Gen Virol*, 2015. **96**(Pt 7): p. 1830-41.
101. Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., Lopez-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., and Segales, J., *A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence*. *Vet Microbiol*, 2008. **128**(1-2): p. 23-35.
102. Opriessnig, T., Xiao, C.T., Gerber, P.F., Halbur, P.G., Matzinger, S.R., and Meng, X.J., *Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV2) exhibits similar virulence to the classical PCV2a and PCV2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs*. *J Gen Virol*, 2014. **95**(Pt 11): p. 2495-2503.
103. Cortey, M., Pileri, E., Sibila, M., Pujols, J., Balasch, M., Plana, J., and Segales, J., *Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008*. *Vet J*, 2011. **187**(3): p. 363-8.
104. Noh, Y.-H., Kim, S.-C., Jeong, C.-G., Lee, S.-C., Lee, D.-U., Yoon, I.-J., and Kim, W.-I.J.V., *Pathological Evaluation of Porcine Circovirus 2d (PCV2d) Strain and Comparative Evaluation of PCV2d and PCV2b Inactivated Vaccines against PCV2d Infection in a Specific Pathogen-Free (SPF) Yucatan Miniature Pig Model*. 2022. **10**(9): p. 1469.
105. Qu, T., Li, R., Yan, M., Luo, B., Yang, T., and Yu, X., *High prevalence of PCV2d in Hunan province, China: a retrospective analysis of samples collected from 2006 to 2016*. *Arch Virol*, 2018. **163**(7): p. 1897-1906.
106. Xiao, C.T., Harmon, K.M., Halbur, P.G., and Opriessnig, T., *PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014-2016*. *Vet Microbiol*, 2016. **197**: p. 72-77.
107. Chae, C., *An emerging porcine circovirus type 2b mutant (mPCV2b) originally known as PCV2d*. *Vet J*, 2015. **203**(1): p. 6-9.
108. Gerber, P.F., Johnson, J., Shen, H., Striegel, D., Xiao, C.T., Halbur, P.G., and Opriessnig, T., *Association of concurrent porcine circovirus (PCV) 2a and 2b infection with PCV associated disease in vaccinated pigs*. *Res Vet Sci*, 2013. **95**(2): p. 775-81.

109. Li, W., Wang, X., Ma, T., Feng, Z., Li, Y., and Jiang, P., *Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China*. *Virus Genes*, 2010. **40**(2): p. 244-51.
110. Sinha, A., Schalk, S., Lager, K.M., Wang, C., and Opriessnig, T., *Singular PCV2a or PCV2b infection results in apoptosis of hepatocytes in clinically affected gnotobiotic pigs*. *Res Vet Sci*, 2012. **92**(1): p. 151-6.
111. Kwon, T., Lee, D.U., Yoo, S.J., Je, S.H., Shin, J.Y., and Lyoo, Y.S., *Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population*. *Virus Res*, 2017. **228**: p. 24-29.
112. Franzo, G., Cortey, M., de Castro, A.M., Piovezan, U., Szabo, M.P., Drigo, M., Segales, J., and Richtzenhain, L.J., *Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution*. *Vet Microbiol*, 2015. **178**(1-2): p. 158-62.
113. Dupont, K., Nielsen, E., Baekbo, P., and Larsen, L.J.V.m., *Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time*. 2008. **128**(1-2): p. 56-64.
114. Liu, X., Wang, F.X., Zhu, H.W., Sun, N., and Wu, H., *Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from China with high homology to PCV2c*. *Arch Virol*, 2016. **161**(6): p. 1591-9.
115. Liu, J., Wei, C., Dai, A., Lin, Z., Fan, K., Fan, J., Liu, J., Luo, M., and Yang, X., *Detection of PCV2e strains in Southeast China*. *PeerJ*, 2018. **6**: p. e4476.
116. Park, K.H., Oh, T., Cho, H., Yang, S., and Chae, C., *The first isolation of porcine circovirus type 2e from a Korean pig*. *Arch Virol*, 2020. **165**(12): p. 2927-2930.
117. Harmon, K.M., Gauger, P.C., Zhang, J., Pineyro, P.E., Dunn, D.D., and Chriswell, A.J., *Whole-Genome Sequences of Novel Porcine Circovirus Type 2 Viruses Detected in Swine from Mexico and the United States*. *Genome Announc*, 2015. **3**(6).
118. Bhattacharjee, U., Sen, A., and Sharma, I., *A retrospective study reveals the Porcine circovirus-2f genotype predominant in the indigenous pig population of North-eastern India*. *Infection, Genetics Evolution*, 2021. **96**: p. 105100.
119. Bao, F., Mi, S., Luo, Q., Guo, H., Tu, C., Zhu, G., and Gong, W., *Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f*. *Transbound Emerg Dis*, 2018. **65**(2): p. 432-440.
120. Rajkhowa, T.K., Lalnunthanga, P., Rao, P.L., Subbiah, M., and Lalrohluia, B., *Emergence of porcine circovirus 2g (PCV2g) and evidence for recombination between genotypes 2g, 2b and 2d among field isolates from non-vaccinated pigs in Mizoram, India*. *Infect Genet Evol*, 2021. **90**: p. 104775.
121. Link, E.K., Eddicks, M., Nan, L., Ritzmann, M., Sutter, G., and Fux, R., *Discriminating the eight genotypes of the porcine circovirus type 2 with TaqMan-based real-time PCR*. *Virol J*, 2021. **18**(1): p. 70.
122. Khayat, R., Brunn, N., Speir, J.A., Hardham, J.M., Ankenbauer, R.G., Schneemann, A., and Johnson, J.E., *The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2*. *J Virol*, 2011. **85**(15): p. 7856-62.

123. Mahe, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E., and Jestin, A., *Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 7): p. 1815-24.
124. Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., and Allan, G.M., *Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 9): p. 2171-9.
125. Fux, R., Sockler, C., Link, E.K., Renken, C., Krejci, R., Sutter, G., Ritzmann, M., and Eddicks, M., *Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains*. Virol J, 2018. **15**(1): p. 25.
126. Meehan, B.M., Creelan, J.L., McNulty, M.S., and Todd, D., *Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 1): p. 221-7.
127. Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Xu, Y., Potts, B., and Meng, X.J., *Detection and in vitro and in vivo characterization of porcine circovirus DNA from a porcine-derived commercial pepsin product*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 11): p. 3377-3382.
128. Hamel, A.L., Lin, L.L., and Nayar, G.P., *Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 5262-7.
129. Niu, G., Chen, S., Li, X., Zhang, L., and Ren, L., *Advances in Crosstalk between Porcine Circoviruses and Host*. Viruses, 2022. **14**(7): p. 1419.
130. Ren, L., Chen, X., and Ouyang, H.J.V.g., *Interactions of porcine circovirus 2 with its hosts*. 2016. **52**: p. 437-444.
131. Finsterbusch, T., Steinfeldt, T., Caliskan, R., and Mankertz, A., *Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1*. Virology, 2005. **343**(1): p. 36-46.
132. Ren, L., Chen, X., and Ouyang, H., *Interactions of porcine circovirus 2 with its hosts*. Virus Genes, 2016. **52**(4): p. 437-44.
133. Mankertz, A., Mankertz, J., Wolf, K., and Buhk, H.J., *Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 2): p. 381-4.
134. Cheung, A.K., *The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2*. Virology, 2003. **313**(2): p. 452-9.
135. Consortium, T.U., *UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023*. Nucleic Acids Research, 2022. **51**(D1): p. D523-D531.
136. Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., and Paul, P.S., *Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 9): p. 2281-2287.
137. Mankertz, A., Hattermann, K., Ehlers, B., and Soike, D., *Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons*. Arch Virol, 2000. **145**(12): p. 2469-79.
138. Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., and Meng, X.J., *Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 13440-6.

139. Meerts, P., Misinzo, G., McNeilly, F., and Nauwynck, H.J., *Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages*. Arch Virol, 2005. **150**(3): p. 427-41.
140. Choi, C.-Y., Rho, S.B., Kim, H.-S., Han, J., Bae, J., Lee, S.J., Jung, W.-W., and Chun, T.J.J.o.G.V., *The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 promotes secretion of IL-6 and IL-8 in porcine epithelial cells by facilitating proteasomal degradation of regulator of G protein signalling 16 through physical interaction*. 2015. **96**(5): p. 1098-1108.
141. Zhang, Y., Zhang, X., Cheng, A., Wang, M., Yin, Z., Huang, J., Jia, R.J.F.i.C., and Microbiology, I., *Apoptosis triggered by orf3 proteins of the circoviridae family*. 2021. **10**: p. 609071.
142. He, J., Cao, J., Zhou, N., Jin, Y., Wu, J., and Zhou, J., *Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2*. J Virol, 2013. **87**(3): p. 1420-9.
143. Gao, Z., Dong, Q., Jiang, Y., Opriessnig, T., Wang, J., Quan, Y., and Yang, Z., *ORF4-protein deficient PCV2 mutants enhance virus-induced apoptosis and show differential expression of mRNAs in vitro*. Virus Res, 2014. **183**: p. 56-62.
144. Lv, Q., Guo, K., Xu, H., Wang, T., and Zhang, Y., *Correction: Identification of Putative ORF5 Protein of Porcine Circovirus Type 2 and Functional Analysis of GFP-Fused ORF5 Protein*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0134203.
145. Choi, C.Y., Choi, Y.C., Park, I.B., Lee, C.H., Kang, S.J., and Chun, T., *The ORF5 protein of porcine circovirus type 2 enhances viral replication by dampening type I interferon expression in porcine epithelial cells*. Vet Microbiol, 2018. **226**: p. 50-58.
146. Li, D., Wang, J., Xu, S., Cai, S., Ao, C., Fang, L., Xiao, S., Chen, H., and Jiang, Y.J.V.r.c., *Identification and functional analysis of the novel ORF6 protein of porcine circovirus type 2 in vitro*. 2018. **42**: p. 1-10.
147. Misinzo, G., Delputte, P.L., Meerts, P., Lefebvre, D.J., and Nauwynck, H.J., *Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3487-94.
148. Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Guzylack-Piriou, L., Herrmann, B., McNeilly, F., Allan, G.M., Summerfield, A., and McCullough, K.C., *Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2*. Immunology, 2005. **115**(3): p. 388-98.
149. Misinzo, G., Delputte, P.L., Lefebvre, D.J., and Nauwynck, H.J., *Porcine circovirus 2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent, actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion*. Virus Res, 2009. **139**(1): p. 1-9.
150. Wei, R., Van Renne, N., and Nauwynck, H.J., *Strain-Dependent Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Entry and Replication in T-Lymphoblasts*. Viruses, 2019. **11**(9).
151. Nauwynck, H.J., Sanchez, R., Meerts, P., Lefebvre, D.J., Saha, D., Huang, L., and Misinzo, G., *Cell tropism and entry of porcine circovirus 2*. Virus Res, 2012. **164**(1-2): p. 43-5.
152. Misinzo, G., Delputte, P.L., and Nauwynck, H.J., *Inhibition of endosome-lysosome system acidification enhances porcine circovirus 2 infection of porcine epithelial cells*. J Virol, 2008. **82**(3): p. 1128-35.
153. Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., Meehan, B.M., Allan, G.M., Summerfield, A., and McCullough, K.C., *Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the*

- absence of apparent cell modulation or replication of the virus.* J Virol, 2003. **77**(24): p. 13288-300.
154. Cao, J., Lin, C., Wang, H., Wang, L., Zhou, N., Jin, Y., Liao, M., and Zhou, J.J.J.o.v., *Circovirus transport proceeds via direct interaction of the cytoplasmic dynein IC1 subunit with the viral capsid protein.* 2015. **89**(5): p. 2777-2791.
 155. Theerawatanasirikul, S., Phecharat, N., Prawettongsopon, C., Chaicumpa, W., and Lekcharoensuk, P., *Dynein light chain DYNLL1 subunit facilitates porcine circovirus type 2 intracellular transports along microtubules.* Arch Virol, 2017. **162**(3): p. 677-686.
 156. Cheung, A.K., *Porcine circovirus: transcription and DNA replication.* Virus Res, 2012. **164**(1-2): p. 46-53.
 157. Faurez, F., Dory, D., Grasland, B., and Jestin, A., *Replication of porcine circoviruses.* Virol J, 2009. **6**: p. 60.
 158. Finsterbusch, T. and Mankertz, A., *Porcine circoviruses--small but powerful.* Virus Res, 2009. **143**(2): p. 177-83.
 159. Steiner, E., Balmelli, C., Herrmann, B., Summerfield, A., and McCullough, K., *Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting.* Virology, 2008. **378**(2): p. 311-22.
 160. Marks, F.S., Almeida, L.L., Driemeier, D., Canal, C., Barcellos, D.E., Guimaraes, J.A., and Reck, J., *Porcine circovirus 2 (PCV2) increases the expression of endothelial adhesion/junction molecules.* Braz J Microbiol, 2016. **47**(4): p. 870-875.
 161. Jiang, H., Wang, D., Wang, J., Zhu, S., She, R., Ren, X., Tian, J., Quan, R., Hou, L., Li, Z., Chu, J., Guo, Y., Xi, Y., Song, H., Yuan, F., Wei, L., and Liu, J., *Induction of Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome in Piglets by Infection with Porcine Circovirus Type 3.* J Virol, 2019. **93**(4).
 162. Arruda, B., Pineyro, P., Derscheid, R., Hause, B., Byers, E., Dion, K., Long, D., Sievers, C., Tangen, J., Williams, T., and Schwartz, K., *PCV3-associated disease in the United States swine herd.* Emerg Microbes Infect, 2019. **8**(1): p. 684-698.
 163. Kim, S.H., Park, J.Y., Jung, J.Y., Kim, H.Y., Park, Y.R., Lee, K.K., Lyoo, Y.S., Yeo, S.G., and Park, C.K., *Detection and genetic characterization of porcine circovirus 3 from aborted fetuses and pigs with respiratory disease in Korea.* J Vet Sci, 2018. **19**(5): p. 721-724.
 164. Tischer, I., Peters, D., Rasch, R., and Pociuli, S., *Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence.* Arch Virol, 1987. **96**(1-2): p. 39-57.
 165. Allan, G., McNeilly, F., Foster, J., and Adair, B.J.V.M., *Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus.* 1994. **41**(3): p. 267-279.
 166. Allan, G.M., Mackie, D.P., McNair, J., Adair, B.M., and McNulty, M.S., *Production, preliminary characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus.* Vet Immunol Immunopathol, 1994. **43**(4): p. 357-71.
 167. McNeilly, F., Allan, G.M., Foster, J.C., Adair, B.M., McNulty, M.S., and Pollock, J., *Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function.* Vet Immunol Immunopathol, 1996. **49**(4): p. 295-306.
 168. Rovira, A., Balasch, M., Segales, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., and Domingo, M., *Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2.* J Virol, 2002. **76**(7): p. 3232-9.

169. Music, N., *In vitro and in vivo virulence evaluation of the new genotype of porcine circovirus type 2 and identification of a new cell line permissive to virus replication*. 2008.
170. Hirai, T., Nunoya, T., Ihara, T., Saitoh, T., Shibuya, K., and Nakamura, K., *Infectivity of porcine circovirus 1 and circovirus 2 in primary porcine hepatocyte and kidney cell cultures*. *J Vet Med Sci*, 2006. **68**(2): p. 179-82.
171. Oh, T. and Chae, C., *First isolation and genetic characterization of porcine circovirus type 3 using primary porcine kidney cells*. *Vet Microbiol*, 2020. **241**: p. 108576.
172. Puvanendiran, S., Stone, S., Yu, W., Johnson, C.R., Abrahante, J., Jimenez, L.G., Griggs, T., Haley, C., Wagner, B., and Murtaugh, M.P., *Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds*. *Virus Res*, 2011. **157**(1): p. 92-8.
173. Patterson, A.R. and Opriessnig, T., *Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2)*. *Anim Health Res Rev*, 2010. **11**(2): p. 217-34.
174. Faccini, S., Barbieri, I., Gilioli, A., Sala, G., Gibelli, L.R., Moreno, A., Sacchi, C., Rosignoli, C., Franzini, G., and Nigrelli, A., *Detection and genetic characterization of Porcine circovirus type 3 in Italy*. *Transbound Emerg Dis*, 2017. **64**(6): p. 1661-1664.
175. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Drigo, M., Cecchinato, M., Martini, M., Mondin, A., and Menandro, M.L., *First report of wild boar susceptibility to Porcine circovirus type 3: High prevalence in the Colli Euganei Regional Park (Italy) in the absence of clinical signs*. *Transbound Emerg Dis*, 2018. **65**(4): p. 957-962.
176. Kim, S.C., Nazki, S., Kwon, S., Juhng, J.H., Mun, K.H., Jeon, D.Y., Jeong, C.G., Khatun, A., Kang, S.J., and Kim, W.I., *The prevalence and genetic characteristics of porcine circovirus type 2 and 3 in Korea*. *BMC Vet Res*, 2018. **14**(1): p. 294.
177. Franzo, G., Cortey, M., Segales, J., Hughes, J., and Drigo, M., *Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms*. *Mol Phylogenet Evol*, 2016. **100**: p. 269-280.
178. Verreault, D., Letourneau, V., Gendron, L., Masse, D., Gagnon, C.A., and Duchaine, C., *Airborne porcine circovirus in Canadian swine confinement buildings*. *Vet Microbiol*, 2010. **141**(3-4): p. 224-30.
179. Larochelle, R., Bielanski, A., Muller, P., and Magar, R., *PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen*. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(12): p. 4629-32.
180. Bolin, S.R., Stoffregen, W.C., Nayar, G.P., and Hamel, A.L., *Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus*. *J Vet Diagn Invest*, 2001. **13**(3): p. 185-94.
181. Krakowka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., and Allan, G., *Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus*. *Vet Pathol*, 2000. **37**(3): p. 254-63.
182. Gerber, P.F., Garrocho, F.M., Lana, A.M., and Lobato, Z.I., *Fetal infections and antibody profiles in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2)*. *Can J Vet Res*, 2012. **76**(1): p. 38-44.

183. Meng, X.J., *Spread like a wildfire--the omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever-expanding association with diseases in pigs*. *Virus Res*, 2012. **164**(1-2): p. 1-3.
184. Sirisereewan, C., Thanawongnuwech, R., and Kedkovid, R.J.P., *Current understanding of the pathogenesis of porcine circovirus 3*. 2022. **11**(1): p. 64.
185. Chen, S., Zhang, L., Li, X., Niu, G., and Ren, L.J.V., *Recent progress on epidemiology and pathobiology of porcine circovirus 3*. 2021. **13**(10): p. 1944.
186. Niu, G., Zhang, X., Ji, W., Chen, S., Li, X., Yang, L., Zhang, L., Ouyang, H., Li, C., Ren, L.J.T., and Diseases, E., *Porcine circovirus 4 rescued from an infectious clone is replicable and pathogenic in vivo*. 2022. **69**(5): p. e1632-e1641.
187. Segales, J., *Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis*. *Virus Res*, 2012. **164**(1-2): p. 10-9.
188. Lee, G., Han, D., Song, J.Y., Lee, Y.S., Kang, K.S., and Yoon, S., *Genomic expression profiling in lymph nodes with lymphoid depletion from porcine circovirus 2-infected pigs*. *J Gen Virol*, 2010. **91**(Pt 10): p. 2585-91.
189. Marruchella, G., Valbonetti, L., Bernabo, N., and Ligios, C., *Depletion of follicular dendritic cells in tonsils collected from PMWS-affected pigs*. *Arch Virol*, 2017. **162**(5): p. 1281-1287.
190. Shibahara, T., Sato, K., Ishikawa, Y., and Kadota, K., *Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome*. *J Vet Med Sci*, 2000. **62**(11): p. 1125-31.
191. Meng, X.J., *Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system*. *Annu Rev Anim Biosci*, 2013. **1**: p. 43-64.
192. Mikami, O., Nakajima, H., Kawashima, K., Yoshii, M., and Nakajima, Y., *Nonsuppurative myocarditis caused by porcine circovirus type 2 in a weak-born piglet*. *J Vet Med Sci*, 2005. **67**(7): p. 735-8.
193. Gu, C., Gao, X., Guo, D., Wang, J., Wu, Q., Nepovimova, E., Wu, W., and Kuca, K., *Combined Effect of Deoxynivalenol (DON) and Porcine Circovirus Type 2 (Pcv2) on Inflammatory Cytokine mRNA Expression*. *Toxins (Basel)*, 2021. **13**(6).
194. Du, Q., Huang, Y., Wang, T., Zhang, X., Chen, Y., Cui, B., Li, D., Zhao, X., Zhang, W., Chang, L., and Tong, D., *Porcine circovirus type 2 activates PI3K/Akt and p38 MAPK pathways to promote interleukin-10 production in macrophages via Cap interaction of gC1qR*. *Oncotarget*, 2016. **7**(14): p. 17492-507.
195. Chang, H.W., Jeng, C.R., Lin, T.L., Liu, J.J., Chiou, M.T., Tsai, Y.C., Chia, M.Y., Jan, T.R., and Pang, V.F., *Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006. **110**(3-4): p. 207-19.
196. Liu, S., Li, Q., Qiao, J., Wang, J., Cui, D., Gu, K., Zhou, S., and Li, H., *Endothelial IL-8 induced by porcine circovirus type 2 affects dendritic cell maturation and antigen-presenting function*. *Virol J*, 2019. **16**(1): p. 154.
197. Zhang, H., Lunney, J.K., Baker, R.B., and Opriessnig, T., *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*, 2011. **140**(1-2): p. 152-8.

198. Darwich, L., Balasch, M., Plana-Duran, J., Segales, J., Domingo, M., and Mateu, E., *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, 2003. **84**(Pt 12): p. 3453-3457.
199. Darwich, L., Pie, S., Rovira, A., Segales, J., Domingo, M., Oswald, I.P., and Mateu, E., *Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 8): p. 2117-2125.
200. Doster, A.R., Subramaniam, S., Yhee, J.Y., Kwon, B.J., Yu, C.H., Kwon, S.Y., Osorio, F.A., and Sur, J.H., *Distribution and characterization of IL-10-secreting cells in lymphoid tissues of PCV2-infected pigs*. J Vet Sci, 2010. **11**(3): p. 177-83.
201. Wang, Z., Chen, J., Zhang, Q.-g., Huang, K., Ma, D., Du, Q., Tong, D., and Huang, Y., *Porcine circovirus type 2 infection inhibits the activation of type I interferon signaling via capsid protein and host gC1qR*. Veterinary Microbiology, 2022. **266**: p. 109354.
202. Hasslung, F.C., Berg, M., Allan, G.M., Meehan, B.M., McNeilly, F., and Fossum, C., *Identification of a sequence from the genome of porcine circovirus type 2 with an inhibitory effect on IFN-alpha production by porcine PBMCs*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 11): p. 2937-2945.
203. Li, J., Lu, M., Huang, B., and Lv, Y., *Porcine circovirus type 2 inhibits interferon- β expression by targeting Karyopherin alpha-3 in PK-15 cells*. Virology, 2018. **520**: p. 75-82.
204. Gao, F., Xie, J.L., Jia, C.W., Ren, H.Y., and Zhou, S.H., *Effects of porcine circovirus type 2 and pseudorabies vaccine co-inoculation on regulatory cytokine mRNA expression in pig peripheral blood mononuclear cells*. Genet Mol Res, 2014. **13**(1): p. 1540-7.
205. Chen, M., Han, J., Zhang, Y., Duan, D., and Zhang, S., *Porcine circovirus type 2 induces type I interferon production via MyD88–IKK α –IRFs signaling rather than NF- κ B in porcine alveolar macrophages in vitro*. Research in veterinary science, 2016. **104**: p. 188-194.
206. Huang, B., Zhang, L., Lu, M., Li, J., and Lv, Y., *PCV2 infection activates the cGAS/STING signaling pathway to promote IFN-beta production and viral replication in PK-15 cells*. Vet Microbiol, 2018. **227**: p. 34-40.
207. Wikstrom, F.H., Meehan, B.M., Berg, M., Timmusk, S., Elving, J., Fuxler, L., Magnusson, M., Allan, G.M., McNeilly, F., and Fossum, C., *Structure-dependent modulation of alpha interferon production by porcine circovirus 2 oligodeoxyribonucleotide and CpG DNAs in porcine peripheral blood mononuclear cells*. J Virol, 2007. **81**(10): p. 4919-27.
208. Kekarainen, T., Montoya, M., Dominguez, J., Mateu, E., and Segales, J., *Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses*. Vet Immunol Immunopathol, 2008. **124**(1-2): p. 41-9.
209. Darwich, L. and Mateu, E., *Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2)*. Virus Res, 2012. **164**(1-2): p. 61-7.
210. Kurtz, S., Grau-Roma, L., Cortey, M., Fort, M., Rodriguez, F., Sibila, M., and Segales, J., *Pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) generate antibody responses capable to neutralise PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins*. Vet Res, 2014. **45**: p. 29.
211. Fort, M., Sibila, M., Nofrarias, M., Perez-Martin, E., Olvera, A., Mateu, E., and Segales, J., *Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of*

- cell-mediated immunity upon PCV2 infection. Vet Immunol Immunopathol, 2010. 137(3-4): p. 226-34.*
212. Martelli, P., Ferrari, L., Morganti, M., De Angelis, E., Bonilauri, P., Guazzetti, S., Caleffi, A., and Borghetti, P., *One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. Vet Microbiol, 2011. 149(3-4): p. 339-51.*
 213. Fort, M., Fernandes, L.T., Nofrarias, M., Diaz, I., Sibila, M., Pujols, J., Mateu, E., and Segales, J., *Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. Vet Immunol Immunopathol, 2009. 129(1-2): p. 101-7.*
 214. Fort, M., Sibila, M., Perez-Martin, E., Nofrarias, M., Mateu, E., and Segales, J., *One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. Vaccine, 2009. 27(30): p. 4031-7.*
 215. Steiner, E., Balmelli, C., Gerber, H., Summerfield, A., and McCullough, K., *Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. BMC Vet Res, 2009. 5: p. 45.*
 216. Krakowka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Gilpin, D., Meehan, B., McCullough, K., and Allan, G., *Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. Viral Immunol, 2002. 15(4): p. 567-82.*
 217. Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Botner, A., Kristensen, C.S., and Nauwynck, H.J., *Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. BMC Vet Res, 2006. 2: p. 6.*
 218. Nielsen, J., Vincent, I.E., Botner, A., Ladekaer-Mikkelsen, A.S., Allan, G., Summerfield, A., and McCullough, K.C., *Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Vet Immunol Immunopathol, 2003. 92(3-4): p. 97-111.*
 219. Grau-Roma, L., Fraile, L., and Segales, J., *Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. Vet J, 2011. 187(1): p. 23-32.*
 220. Alarcon, P., Rushton, J., Nathues, H., and Wieland, B., *Economic efficiency analysis of different strategies to control post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 subclinical infection in 3-weekly batch system farms. Prev Vet Med, 2013. 110(2): p. 103-18.*
 221. Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink, F., and Segales, J., *Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. Vaccine, 2008. 26(8): p. 1063-71.*
 222. Opriessnig, T., Madson, D.M., Prickett, J.R., Kuhar, D., Lunney, J.K., Elsener, J., and Halbur, P.G., *Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. Vet Microbiol, 2008. 131(1-2): p. 103-14.*
 223. Kixmoller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmuller, A., Elbers, K., and Fachinger, V., *Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. Vaccine, 2008. 26(27-28): p. 3443-51.*

224. Fachinger, V., Bischoff, R., Jedidia, S.B., Saalmuller, A., and Elbers, K., *The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex*. *Vaccine*, 2008. **26**(11): p. 1488-99.
225. Horlen, K.P., Dritz, S.S., Nietfeld, J.C., Henry, S.C., Hesse, R.A., Oberst, R., Hays, M., Anderson, J., and Rowland, R.R., *A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2*. *J Am Vet Med Assoc*, 2008. **232**(6): p. 906-12.
226. Segales, J., Urniza, A., Alegre, A., Bru, T., Crisci, E., Nofrarias, M., Lopez-Soria, S., Balasch, M., Sibila, M., Xu, Z., Chu, H.J., Fraile, L., and Plana-Duran, J., *A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms*. *Vaccine*, 2009. **27**(52): p. 7313-21.
227. Kolyvushko, O., Rakibuzzaman, A., Pillatzki, A., Webb, B., and Ramamoorthy, S., *Efficacy of a Commercial PCV2a Vaccine with a Two-Dose Regimen Against PCV2d*. *Vet Sci*, 2019. **6**(3).
228. Opriessnig, T., Xiao, C.-T., Halbur, P.G., Gerber, P.F., Matzinger, S.R., and Meng, X.-J.J.V., *A commercial porcine circovirus (PCV) type 2a-based vaccine reduces PCV2d viremia and shedding and prevents PCV2d transmission to naive pigs under experimental conditions*. 2017. **35**(2): p. 248-254.
229. Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink, F., and Segalés, J.J.V., *Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins*. 2008. **26**(8): p. 1063-1071.
230. Keffaber, K., *Reproduction failure of unknown etiology*. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 1989. **1**: p. 1-9.
231. Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J., Ter Laak, E., Bloemraad, M., De Kluyver, E., Kragten, C., Van Buiten, L.d., Den Besten, A., and Wagenaar, F., *Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus*. *Veterinary Quarterly*, 1991. **13**(3): p. 121-130.
232. Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Pol, J.M., Wagenaar, F., Moormann, R.J., Hulst, M.M., Bloemraad, R., den Besten, A., Zetstra, T., and Terpstra, C., *Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad*. *Veterinary microbiology*, 1992. **33**(1-4): p. 185-193.
233. Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., and Joo, H.S., *Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1992. **4**(2): p. 117-126.
234. Dea, S., Bilodeau, R., Athanassios, R., Sauvageau, R.A., and Martineau, G.P., *Quebec. Isolation of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Quebec*. *Can Vet J*, 1992. **33**(8): p. 552-3.
235. Martineau, G., Bilodeau, R., Sauvageau, R., and Dea, S., *Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) au Québec: Données cliniques, pathologiques et virologiques*. 1992.

236. Lefkowitz, E.J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G., and Smith, D.B., *Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Nucleic acids research, 2018. **46**(D1): p. D708-D717.
237. Han, K., Seo, H.W., Oh, Y., Kang, I., Park, C., and Chae, C., *Comparison of the virulence of European and North American genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected pigs*. Vet J, 2013. **195**(3): p. 313-8.
238. Han, K., Seo, H., Park, C., Kang, I., Youn, S.-K., Lee, S., Kim, S.-H., and Chae, C., *Comparative virulence of reproductive diseases caused by type 1 (European-like) and type 2 (North American-like) porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected pregnant gilts*. Journal of comparative pathology, 2014. **150**(2-3): p. 297-305.
239. Allende, R., Lewis, T., Lu, Z., Rock, D., Kutish, G., Ali, A., Doster, A., and Osorio, F., *North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions*. Journal of General Virology, 1999. **80**(2): p. 307-315.
240. Murtaugh, M.P., Elam, M., and Kakach, L., *Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus*. Archives of virology, 1995. **140**: p. 1451-1460.
241. Bautista, E.M., Goyal, S.M., and Collins, J.E., *Serologic survey for Lelystad and VR-2332 strains of porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) virus in US swine herds*. J Vet Diagn Invest, 1993. **5**(4): p. 612-4.
242. Ropp, S.L., Wees, C.E., Fang, Y., Nelson, E.A., Rossow, K.D., Bien, M., Arndt, B., Preszler, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Collins, J.E., Benfield, D.A., and Faaberg, K.S., *Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States*. J Virol, 2004. **78**(7): p. 3684-703.
243. Yoshii, M., Kaku, Y., Murakami, Y., Shimizu, M., Kato, K., and Ikeda, H., *Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan*. Arch Virol, 2005. **150**(11): p. 2313-24.
244. Mortensen, S., Stryhn, H., Sogaard, R., Boklund, A., Stark, K.D., Christensen, J., and Willeberg, P., *Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus*. Prev Vet Med, 2002. **53**(1-2): p. 83-101.
245. Spilman, M.S., Welbon, C., Nelson, E., and Dokland, T., *Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 3): p. 527-535.
246. Dokland, T., *The structural biology of PRRSV*. Virus research, 2010. **154**(1-2): p. 86-97.
247. Dea, S., Gagnon, C.A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., and Rogan, D., *Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates*. Arch Virol, 2000. **145**(4): p. 659-88.
248. Wissink, E.H., Kroese, M.V., van Wijk, H.A., Rijsewijk, F.A., Meulenber, J.J., and Rottier, P.J., *Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. J Virol, 2005. **79**(19): p. 12495-506.
249. Faaberg, K., Balasuriya, U., Brinton, M., Gorbalenya, A., Leung, F., Nauwynck, H., Snijder, E., Stadejek, T., Yang, H., and Yoo, D., *Family arteriviridae*. Virus taxonomy. Ninth report

- of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2012: p. 796-805.
250. De Vries, A.A., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., and De Groot, R.J. *The genome organization of the Nidovirales: similarities and differences between arteri-, toro-, and coronaviruses.* in *Seminars in VIROLOGY*. 1997. Elsevier.
 251. Domingo, E., Escarmís, C., Sevilla, N., Moya, A., Elena, S.F., Quer, J., Novella, I.S., and Holland, J.J., *Basic concepts in RNA virus evolution.* The FASEB Journal, 1996. **10**(8): p. 859-864.
 252. Forsberg, R., *Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes.* Mol Biol Evol, 2005. **22**(11): p. 2131-4.
 253. Forsberg, R., Oleksiewicz, M.B., Petersen, A.M., Hein, J., Botner, A., and Storgaard, T., *A molecular clock dates the common ancestor of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus at more than 10 years before the emergence of disease.* Virology, 2001. **289**(2): p. 174-9.
 254. Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., and Gojobori, T., *The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses.* Molecular biology evolution, 2005. **22**(4): p. 1024-1031.
 255. Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Abrahante, J.E., Lam, T.T., and Leung, F.C., *The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.* Virus Res, 2010. **154**(1-2): p. 18-30.
 256. Liu, Y., Li, J., Yang, J., Zeng, H., Guo, L., Ren, S., Sun, W., Chen, Z., Cong, X., and Shi, J., *Emergence of different recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome viruses, China.* Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 1-15.
 257. Yuan, S., Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Schmitt, B.J., and Faaberg, K.S., *Recombination between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.* Virus Res, 1999. **61**(1): p. 87-98.
 258. Kappes, M.A. and Faaberg, K.S., *PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity.* Virology, 2015. **479**: p. 475-486.
 259. Dea, S., Gagnon, C., Mardassi, H., Pirzadeh, B., and Rogan, D., *Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates.* Archives of virology, 2000. **145**: p. 659-688.
 260. Han, M., Kim, C.Y., Rowland, R.R., Fang, Y., Kim, D., and Yoo, D., *Biogenesis of non-structural protein 1 (nsp1) and nsp1-mediated type I interferon modulation in arteriviruses.* Virology, 2014. **458**: p. 136-150.
 261. Music, N. and Gagnon, C.A., *The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis.* Anim Health Res Rev, 2010. **11**(2): p. 135-63.
 262. Meulenbergh, J.J., Petersen-Den Besten, A., De Kluyver, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., and Wensvoort, G., *Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus.* Virology, 1995. **206**(1): p. 155-163.
 263. Van Marle, G., Dobbe, J.C., Gultyaev, A.P., Luytjes, W., Spaan, W.J., and Snijder, E.J., *Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense*

- and antisense transcription-regulating sequences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(21): p. 12056-12061.
264. Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., and Benfield, D.A., *Structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)*. Adv Exp Med Biol, 1995. **380**: p. 321-3.
 265. Andreyev, V.G., Wesley, R.D., Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., and Lager, K.M., *Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5*. Arch Virol, 1997. **142**(5): p. 993-1001.
 266. Xie, C., Ha, Z., Nan, F., Zhang, Y., Zhang, H., Li, J., Zhang, P., Han, J., Zhang, H., Zhuang, X., Zhang, J., Lu, H., and Jin, N., *Characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (ORF5 RFLP 1-7-4 viruses) in northern China*. Microb Pathog, 2020. **140**: p. 103941.
 267. Nilubol, D., Tripipat, T., Hoonsuwan, T., Tipsombatboon, P., and Piriyaongsa, J., *Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genotypes I and II in Thailand*. Arch Virol, 2013. **158**(5): p. 943-53.
 268. Zhou, Y.J., Yu, H., Tian, Z.J., Li, G.X., Hao, X.F., Yan, L.P., Peng, J.M., An, T.Q., Xu, A.T., Wang, Y.X., Wei, T.C., Zhang, S.R., Cai, X.H., Feng, L., Li, X., Zhang, G.H., Zhou, L.J., and Tong, G.Z., *Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in China from 2006 to 2008*. Virus Res, 2009. **144**(1-2): p. 136-44.
 269. Yin, G., Gao, L., Shu, X., Yang, G., Guo, S., and Li, W., *Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in southwest China from 2007 to 2009*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33756.
 270. Key, K.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Swenson, S.L., Toth, T.E., and Meng, X.J., *Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates*. Vet Microbiol, 2001. **83**(3): p. 249-63.
 271. Chen, N., Tribble, B.R., Kerrigan, M.A., Tian, K., and Rowland, R.R.R., *ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a target of diversifying selection as infection progresses from acute infection to virus rebound*. Infect Genet Evol, 2016. **40**: p. 167-175.
 272. Ladinig, A., Wilkinson, J., Ashley, C., Detmer, S.E., Lunney, J.K., Plastow, G., and Harding, J.C., *Variation in fetal outcome, viral load and ORF5 sequence mutations in a large scale study of phenotypic responses to late gestation exposure to type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e96104.
 273. Larochelle, R., D'Allaire, S., and Magar, R., *Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Quebec*. Virus Res, 2003. **96**(1-2): p. 3-14.
 274. Guzman, M., Melendez, R., Jimenez, C., Piche, M., Jimenez, E., Leon, B., Cordero, J.M., Ramirez-Carvajal, L., Uribe, A., Van Nes, A., Stegeman, A., and Romero, J.J., *Analysis of ORF5 sequences of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) circulating within swine farms in Costa Rica*. BMC Vet Res, 2021. **17**(1): p. 217.
 275. Nilubol, D., Tripipat, T., Hoonsuwan, T., Tipsombatboon, P., and Piriyaongsa, J., *Dynamics and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)*

- ORF5 following modified live PRRSV vaccination in a PRRSV-infected herd.* Arch Virol, 2014. **159**(1): p. 17-27.
276. Pesente, P., Rebonato, V., Sandri, G., Giovanardi, D., Ruffoni, L.S., and Torriani, S., *Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: a showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management.* Vet Microbiol, 2006. **114**(3-4): p. 214-24.
277. Lambert, M.E., Delisle, B., Arsenault, J., Poljak, Z., and D'Allaire, S., *Positioning Quebec ORF5 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) within Canada and worldwide diversity.* Infect Genet Evol, 2019. **74**: p. 103999.
278. Martin-Valls, G.E., Kvisgaard, L.K., Tello, M., Darwich, L., Cortey, M., Burgara-Estrella, A.J., Hernandez, J., Larsen, L.E., and Mateu, E., *Analysis of ORF5 and full-length genome sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates of genotypes 1 and 2 retrieved worldwide provides evidence that recombination is a common phenomenon and may produce mosaic isolates.* J Virol, 2014. **88**(6): p. 3170-81.
279. Kroese, M.V., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Bos-de Ruijter, J.N., Peeters, B.P., Meulenber, J.J., Cornelissen, L.A., and Snijder, E.J., *The nsp1 α and nsp1 β papain-like autoproteases are essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA synthesis.* Journal of general virology, 2008. **89**(2): p. 494-499.
280. Den Boon, J., Faaberg, K.S., Meulenber, J., Wassenaar, A., Plagemann, P., Gorbalenya, A.E., and Snijder, E.J., *Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases.* Journal of virology, 1995. **69**(7): p. 4500-4505.
281. Snijder, E.J., Kikkert, M., and Fang, Y., *Arterivirus molecular biology and pathogenesis.* Journal of General Virology, 2013. **94**(10): p. 2141-2163.
282. Brown, E., Lawson, S., Welbon, C., Gnanandarajah, J., Li, J., Murtaugh, M.P., Nelson, E.A., Molina, R.M., Zimmerman, J.J., and Rowland, R.R., *Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II.* Clinical Vaccine Immunology, 2009. **16**(5): p. 628-635.
283. Johnson, C.R., Yu, W., and Murtaugh, M.P., *Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus.* Journal of General Virology, 2007. **88**(4): p. 1184-1195.
284. Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., and Faaberg, K.S., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents.* J Virol, 1999. **73**(1): p. 270-80.
285. Snijder, E.J., Wassenaar, A.L., Den Boon, J.A., and Spaan, W.J., *Proteolytic processing of the arterivirus replicase.* Corona-and Related Viruses: Current Concepts in Molecular Biology Pathogenesis, 1995: p. 443-451.
286. Wang, F.-X., Song, N., Chen, L.-Z., Cheng, S.-P., Wu, H., and Wen, Y.-J., *Non-structural protein 2 of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: a crucial protein in viral pathogenesis, immunity and diagnosis.* Research in veterinary science, 2013. **95**(1): p. 1-7.

287. Sun, Z., Li, Y., Ransburgh, R., Snijder, E.J., and Fang, Y., *Nonstructural protein 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits the antiviral function of interferon-stimulated gene 15*. Journal of virology, 2012. **86**(7): p. 3839-3850.
288. Sun, Z., Chen, Z., Lawson, S.R., and Fang, Y., *The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and interferon antagonism functions*. Journal of virology, 2010. **84**(15): p. 7832-7846.
289. Snijder, E.J., van Tol, H., Roos, N., and Pedersen, K.W., *Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex*. Journal of General Virology, 2001. **82**(5): p. 985-994.
290. Pedersen, K.W., van der Meer, Y., Roos, N., and Snijder, E.J., *Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex*. Journal of virology, 1999. **73**(3): p. 2016-2026.
291. Ziebuhr, J., Snijder, E.J., and Gorbalenya, A.E., *Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales*. Journal of General Virology, 2000. **81**(4): p. 853-879.
292. van Aken, D., Zevenhoven-Dobbe, J., Gorbalenya, A.E., and Snijder, E.J., *Proteolytic maturation of replicase polyprotein pp1a by the nsp4 main proteinase is essential for equine arteritis virus replication and includes internal cleavage of nsp7*. Journal of general virology, 2006. **87**(12): p. 3473-3482.
293. Zhang, M., Cao, Z., Xie, J., Zhu, W., Zhou, P., Gu, H., Sun, L., Su, S., and Zhang, G., *Mutagenesis analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 7*. Virus genes, 2013. **47**: p. 467-477.
294. Fang, Y. and Snijder, E.J., *The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins*. Virus research, 2010. **154**(1-2): p. 61-76.
295. Beerens, N., Selisko, B., Ricagno, S., Imbert, I., Van Der Zanden, L., Snijder, E.J., and Canard, B., *De novo initiation of RNA synthesis by the arterivirus RNA-dependent RNA polymerase*. Journal of virology, 2007. **81**(16): p. 8384-8395.
296. Bautista, E.M., Faaberg, K.S., Mickelson, D., and McGruder, E.D., *Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Virology, 2002. **298**(2): p. 258-270.
297. Wissink, E., Kroese, M., Van Wijk, H., Rijsewijk, F., Meulenbergh, J., and Rottier, P., *Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Journal of virology, 2005. **79**(19): p. 12495-12506.
298. Das, P.B., Dinh, P.X., Ansari, I.H., De Lima, M., Osorio, F.A., and Pattnaik, A.K., *The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163*. Journal of virology, 2010. **84**(4): p. 1731-1740.
299. Tian, D., Wei, Z., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Liu, R., Tong, G., Snijder, E.J., and Yuan, S., *Arterivirus minor envelope proteins are a major determinant of viral tropism in cell culture*. Journal of virology, 2012. **86**(7): p. 3701-3712.
300. Pujhari, S., Baig, T.T., and Zakhartchouk, A.N., *Potential role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus structural protein GP2 in apoptosis inhibition*. BioMed research international, 2014. **2014**.

301. Lee, C. and Yoo, D., *The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties*. *Virology*, 2006. **355**(1): p. 30-43.
302. Snijder, E.J., van Tol, H., Pedersen, K.W., Raamsman, M.J., and de Vries, A.A., *Identification of a novel structural protein of arteriviruses*. *Journal of virology*, 1999. **73**(8): p. 6335-6345.
303. Mardassi, H., Gonin, P., Gagnon, C.A., Massie, B., and Dea, S., *A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form*. *Journal of virology*, 1998. **72**(8): p. 6298-6306.
304. Vu, H.L., Kwon, B., Yoon, K.-J., Laegreid, W.W., Pattnaik, A.K., and Osorio, F.A., *Immune evasion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through glycan shielding involves both glycoprotein 5 as well as glycoprotein 3*. *Journal of virology*, 2011. **85**(11): p. 5555-5564.
305. Meulenbergh, J., Van Nieuwstadt, A., van Essen-Zandbergen, A., and Langeveld, J., *Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus*. *Journal of virology*, 1997. **71**(8): p. 6061-6067.
306. Díaz, I., Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., and Mateu, E., *In silico prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype-I (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. *Vaccine*, 2009. **27**(41): p. 5603-5611.
307. Kwang, J., Zuckermann, F., Ross, G., Yang, S., OSORIO, F., Liu, W., and Low, S., *Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7*. *Research in veterinary science*, 1999. **67**(2): p. 199-201.
308. Mardassi, H., Massie, B., and Dea, S., *Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. *Virology*, 1996. **221**(1): p. 98-112.
309. Snijder, E.J., Dobbe, J.C., and Spaan, W.J., *Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity*. *Journal of virology*, 2003. **77**(1): p. 97-104.
310. Gonin, P., Pirzadeh, B., Gagnon, C.A., and Dea, S., *Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1999. **11**(1): p. 20-26.
311. Ansari, I.H., Kwon, B., Osorio, F.A., and Pattnaik, A.K., *Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies*. *Journal of virology*, 2006. **80**(8): p. 3994-4004.
312. Sun, L., Li, Y., Liu, R., Wang, X., Gao, F., Lin, T., Huang, T., Yao, H., Tong, G., and Fan, H., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF5a protein is essential for virus viability*. *Virus research*, 2013. **171**(1): p. 178-185.
313. Robinson, S.R., Figueiredo, M.C., Abrahante, J.E., and Murtaugh, M.P., *Immune response to ORF5a protein immunization is not protective against porcine reproductive and*

- respiratory syndrome virus infection*. *Veterinary microbiology*, 2013. **164**(3-4): p. 281-285.
314. Firth, A.E., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Wills, N.M., Go, Y.Y., Balasuriya, U.B., Atkins, J.F., Snijder, E.J., and Posthuma, C.C., *Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production*. *The Journal of general virology*, 2011. **92**(Pt 5): p. 1097.
315. Johnson, C.R., Griggs, T.F., Gnanandarajah, J., and Murtaugh, M.P., *Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses*. *The Journal of general virology*, 2011. **92**(Pt 5): p. 1107.
316. Lopez, O. and Osorio, F., *Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity*. *Veterinary immunology immunopathology*
2004. **102**(3): p. 155-163.
317. Sagong, M. and Lee, C., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein modulates interferon- β production by inhibiting IRF3 activation in immortalized porcine alveolar macrophages*. *Archives of virology*, 2011. **156**: p. 2187-2195.
318. Zhang, Q. and Yoo, D., *PRRS virus receptors and their role for pathogenesis*. *Veterinary microbiology*, 2015. **177**(3-4): p. 229-241.
319. Delputte, P., Costers, S., and Nauwynck, H., *Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin*. *Journal of general virology*, 2005. **86**(5): p. 1441-1445.
320. Kim, J.-K., Fahad, A.-M., Shanmukhappa, K., and Kapil, S., *Defining the cellular target (s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10*. *Journal of virology*, 2006. **80**(2): p. 689-696.
321. Shanmukhappa, K., Kim, J.K., and Kapil, S., *Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection*. *Viol J*, 2007. **4**: p. 62.
322. Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L., and Nauwynck, H.J., *Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. *J Gen Virol*, 2008. **89**(Pt 12): p. 2943-2953.
323. Van Gorp, H., Delputte, P.L., and Nauwynck, H.J., *Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy*. *Molecular immunology*, 2010. **47**(7-8): p. 1650-1660.
324. Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P.A., and Nauwynck, H.J., *Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages*. *J Virol*, 2003. **77**(15): p. 8207-15.
325. Van Breedam, W., Van Gorp, H., Zhang, J.Q., Crocker, P.R., Delputte, P.L., and Nauwynck, H.J., *The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(1): p. e1000730.
326. Pineyro, P.E., Subramaniam, S., Kenney, S.P., Heffron, C.L., Gimenez-Lirola, L.G., and Meng, X.J., *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*, 2016. **29**(10): p. 546-556.
327. Delputte, P.L. and Nauwynck, H.J., *Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus*. *Journal of virology*, 2004. **78**(15): p. 8094-8101.
328. Nauwynck, H., Duan, X., Favoreel, H., Van Oostveldt, P., and Pensaert, M., *Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis*. *Journal of General Virology*, 1999. **80**(2): p. 297-305.
329. Jusa, E.R., Inaba, Y., Kouno, M., and Hirose, O., *Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. *Am J Vet Res*, 1997. **58**(5): p. 488-91.
330. Kreutz, L.C. and Ackermann, M.R., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway*. *Virus Res*, 1996. **42**(1-2): p. 137-47.
331. Huang, L., Zhang, Y.P., Yu, Y.L., Sun, M.X., Li, C., Chen, P.Y., and Mao, X., *Role of lipid rafts in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in MARC-145 cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **414**(3): p. 545-50.
332. Sun, Y., Xiao, S., Wang, D., Luo, R., Li, B., Chen, H., and Fang, L., *Cellular membrane cholesterol is required for porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry and release in MARC-145 cells*. *Sci China Life Sci*, 2011. **54**(11): p. 1011-8.
333. Kim, J.K., Fahad, A.M., Shanmukhappa, K., and Kapil, S., *Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10*. *J Virol*, 2006. **80**(2): p. 689-96.
334. Zhang, W., Chen, K., Zhang, X., Guo, C., Chen, Y., and Liu, X., *An integrated analysis of membrane remodeling during porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and assembly*. *PLoS One*, 2018. **13**(7): p. e0200919.
335. Miller, W.A. and Koev, G., *Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses*. *Virology*, 2000. **273**(1): p. 1-8.
336. Dea, S., Sawyer, N., Alain, R., and Athanassious, R., *Ultrastructural characteristics and morphogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus propagated in the highly permissive MARC-145 cell clone*. 1995: Springer.
337. Duan, X., Nauwynck, H.J., and Pensaert, M.B., *Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)*. *Vet Microbiol*, 1997. **56**(1-2): p. 9-19.
338. Van Breedam, W., Delputte, P.L., Van Gorp, H., Misinzo, G., Vanderheijden, N., Duan, X., and Nauwynck, H.J., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage*. *J Gen Virol*, 2010. **91**(Pt 7): p. 1659-67.
339. Halbur, P., Paul, P., Frey, M., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.-J., Andrews, J., Lum, M., and Rathje, J., *Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus*. *Veterinary pathology*, 1996. **33**(2): p. 159-170.
340. Halbur, P.G., Andrews, J.J., Huffman, E.L., Paul, P.S., Meng, X.J., and Niyo, Y., *Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of*

- porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung*. J Vet Diagn Invest, 1994. **6**(2): p. 254-7.
341. Pol, J., J. Van Dijk, G. Wensvoort and C. Terpstra (1991). "Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS))." *Veterinary Quarterly* **13**(3): 137-143.
342. Rossow, K.D., Benfield, D.A., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., and Collins, J.E., *Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs*. Vet Pathol, 1996. **33**(5): p. 551-6.
343. Ye, N., Wang, B., Feng, W., Tang, D., and Zeng, Z., *PRRS virus receptors and an alternative pathway for viral invasion*. Virus Research, 2022: p. 198885.
344. Provost, C., Jia, J.J., Music, N., Levesque, C., Lebel, M.E., del Castillo, J.R., Jacques, M., and Gagnon, C.A., *Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line*. Virol J, 2012. **9**: p. 267.
345. Weingartl, H., Sabara, M., Pasick, J., Van Moorlehem, E., and Babiuk, L., *Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages: partial characterization and virus susceptibility*. Journal of virological methods, 2002. **104**(2): p. 203-216.
346. Lee, Y.J., Park, C.K., Nam, E., Kim, S.H., Lee, O.S., Lee du, S., and Lee, C., *Generation of a porcine alveolar macrophage cell line for the growth of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. J Virol Methods, 2010. **163**(2): p. 410-5.
347. Xu, Y.-l., Wu, S.-p., Li, Y.-g., Sun, F.-x., Wang, Q.-j., Zhao, Q., Yu, J., Tian, F.-l., Wu, J.-q., and Zhu, R.-l., *A porcine alveolar macrophage cell line stably expressing CD163 demonstrates virus replication and cytokine secretion characteristics similar to primary alveolar macrophages following PRRSV infection*. Veterinary Microbiology, 2020. **244**: p. 108690.
348. Huang, Y., Guo, R., Zhang, Y., Zhang, X., Xia, X., and Sun, H., *[Establishment of a porcine CD151 transgenic PK-15 cell line susceptible to porcine reproductive and respiratory syndrome virus]*. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2013. **53**(5): p. 507-14.
349. Provost, C., Hamonic, G., Gagnon, C.A., and Meurens, F., *Dual infections of CD163 expressing NPTr epithelial cells with influenza A virus and PRRSV*. Veterinary microbiology, 2017. **207**: p. 143-148.
350. Calvert, J.G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G., and Welch, S.-K.W., *CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses*. Journal of virology, 2007. **81**(14): p. 7371-7379.
351. Huang, Y., Dryman, B., Li, W., and Meng, X., *Porcine DC-SIGN: molecular cloning, gene structure, tissue distribution and binding characteristics*. Developmental Comparative Immunology, 2009. **33**(4): p. 464-480.
352. Bierk, M.D., Dee, S.A., Rossow, K.D., Otake, S., Collins, J.E., and Molitor, T.W., *Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls*. Can J Vet Res, 2001. **65**(4): p. 261-6.
353. Cho, J.G. and Dee, S.A., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Theriogenology, 2006. **66**(3): p. 655-62.

354. Balasuriya, U.B. and Carossino, M., *Reproductive effects of arteriviruses: equine arteritis virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections*. *Curr Opin Virol*, 2017. **27**: p. 57-70.
355. Pileri, E. and Mateu, E., *Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination*. *Vet Res*, 2016. **47**(1): p. 108.
356. Kranker, S., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., and Botner, A., *Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)*. *Vet Microbiol*, 1998. **61**(1-2): p. 21-31.
357. Benfield, D., Nelson, J., Rossow, K., Nelson, C., Steffen, M., and Rowland, R., *Diagnosis of persistent or prolonged porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections*. *Veterinary Research*, 2000.
358. Pitkin, A., Deen, J., and Dee, S., *Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. *Can J Vet Res*, 2009. **73**(4): p. 298-302.
359. Dee, S.A., Deen, J., Otake, S., and Pijoan, C., *An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs*. *Can J Vet Res*, 2004. **68**(2): p. 128-33.
360. Batista, L., Dee, S.A., Rossow, K.D., Deen, J., and Pijoan, C., *Assessing the duration of persistence and shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of breeding-age gilts*. *Can J Vet Res*, 2002. **66**(3): p. 196-200.
361. Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., and Benfield, D.A., *Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs*. *Vet Pathol*, 1995. **32**(4): p. 361-73.
362. Bloemraad, M., de Kluijver, E.P., Petersen, A., Burkhardt, G.E., and Wensvoort, G., *Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs*. *Vet Microbiol*, 1994. **42**(4): p. 361-71.
363. Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., Benfield, D.A., and Collins, J.E., *Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs*. *J Vet Diagn Invest*, 1994. **6**(1): p. 3-12.
364. Prieto, C., Garcia, C., Simarro, I., and Castro, J.M., *Temporal localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in reproductive tissues of experimentally infected boars*. *Theriogenology*, 2003. **60**(8): p. 1505-14.
365. Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Nelson, J.K., Hines, R.J., Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Katz, J.B., Yaeger, M.J., Chase, C.C., and et al., *Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR*. *J Clin Microbiol*, 1995. **33**(7): p. 1730-4.
366. Gradil, C., Dubuc, C., and Eaglesome, M.D., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: seminal transmission*. *Vet Rec*, 1996. **138**(21): p. 521-2.
367. Chaudhari, J., Liew, C.S., Workman, A.M., Riethoven, J.M., Steffen, D., Sillman, S., and Vu, H.L.X., *Host Transcriptional Response to Persistent Infection with a Live-Attenuated Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain*. *Viruses*, 2020. **12**(8).

368. Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Hu, Y., Chen, X., Hu, D., and Tian, X., *Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark*. PloS one, 2007. **2**(6): p. e526.
369. Han, D., Hu, Y., Li, L., Tian, H., Chen, Z., Wang, L., Ma, H., Yang, H., and Teng, K., *Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection results in acute lung injury of the infected pigs*. Vet Microbiol, 2014. **169**(3-4): p. 135-46.
370. Yu, J., Wu, J., Zhang, Y., Guo, L., Cong, X., Du, Y., Li, J., Sun, W., Shi, J., and Peng, J., *Concurrent highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection accelerates Haemophilus parasuis infection in conventional pigs*. Veterinary microbiology, 2012. **158**(3-4): p. 316-321.
371. Thanawongnuwech, R., Brown, G., Halbur, P., Roth, J., Royer, R., and Thacker, B., *Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to Streptococcus suis infection*. Veterinary pathology, 2000. **37**(2): p. 143-152.
372. Solano, G.I., Segalés, J., Collins, J.E., Molitor, T.W., and Pijoan, C., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with Haemophilus parasuis*. Veterinary Microbiology, 1997. **55**(1-4): p. 247-257.
373. Karniychuk, U.U. and Nauwynck, H.J., *Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection*. Vet Res, 2013. **44**: p. 95.
374. Wagner, J., Kneucker, A., Liebler-Tenorio, E., Fachinger, V., Glaser, M., Pesch, S., Murtaugh, M.P., and Reinhold, P., *Respiratory function and pulmonary lesions in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Vet J, 2011. **187**(3): p. 310-9.
375. Ding, Y., Wubshet, A.K., Ding, X., Zhang, Z., Li, Q., Dai, J., Hou, Q., Hu, Y., and Zhang, J., *Evaluation of four commercial vaccines for the protection of piglets against the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (hp-PRRSV) QH-08 strain*. Vaccines, 2021. **9**(9): p. 1020.
376. Liu, Y., Du, Y., Wang, H., Du, L., and Feng, W.H., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) up-regulates IL-8 expression through TAK-1/JNK/AP-1 pathways*. Virology, 2017. **506**: p. 64-72.
377. Diaz, I., Gimeno, M., Darwich, L., Navarro, N., Kuzemtseva, L., Lopez, S., Galindo, I., Segales, J., Martin, M., Pujols, J., and Mateu, E., *Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection*. Vet Res, 2012. **43**: p. 30.
378. Xu, Y., Wang, H., Zhang, X., Zheng, X., Zhu, Y., Han, H., and Feng, W.H., *Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) induces IL-6 production through TAK-1/JNK/AP-1 and TAK-1/NF-kappaB signaling pathways*. Vet Microbiol, 2021. **256**: p. 109061.
379. Suradhat, S., Thanawongnuwech, R., and Poovorawan, Y., *Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 2): p. 453-459.
380. Wongyanin, P., Buranapraditkul, S., Yoo, D., Thanawongnuwech, R., Roth, J.A., and Suradhat, S., *Role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid*

- protein in induction of interleukin-10 and regulatory T-lymphocytes (Treg)*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 6): p. 1236-1246.
381. Yu, J., Liu, Y., Zhang, Y., Zhu, X., Ren, S., Guo, L., Liu, X., Sun, W., Chen, Z., and Cong, X., *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*. Microbial pathogenesis, 2017. **109**: p. 319-324.
382. Patton, J.B., Rowland, R.R., Yoo, D., and Chang, K.O., *Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages*. Virus Res, 2009. **140**(1-2): p. 161-71.
383. Aasted, B., Bach, P., Nielsen, J., and Lind, P., *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, 2002. **9**(6): p. 1229-34.
384. Ait-Ali, T., Wilson, A.D., Westcott, D.G., Clapperton, M., Waterfall, M., Mellencamp, M.A., Drew, T.W., Bishop, S.C., and Archibald, A.L., *Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated Swine alveolar macrophages*. Viral Immunol, 2007. **20**(1): p. 105-18.
385. Miguel, J.C., Chen, J., Van Alstine, W.G., and Johnson, R.W., *Expression of inflammatory cytokines and Toll-like receptors in the brain and respiratory tract of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Vet Immunol Immunopathol, 2010. **135**(3-4): p. 314-9.
386. Chen, Z., Zhou, X., Lunney, J.K., Lawson, S., Sun, Z., Brown, E., Christopher-Hennings, J., Knudsen, D., Nelson, E., and Fang, Y., *Immunodominant epitopes in nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are dispensable for replication, but play an important role in modulation of the host immune response*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 4): p. 1047-57.
387. Renson, P., Fablet, C., Le Dimna, M., Mahe, S., Touzain, F., Blanchard, Y., Paboeuf, F., Rose, N., and Bourry, O., *Preparation for emergence of an Eastern European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strain in Western Europe: Immunization with modified live virus vaccines or a field strain confers partial protection*. Vet Microbiol, 2017. **204**: p. 133-140.
388. Zhu, Z., Liu, P., Yuan, L., Lian, Z., Hu, D., Yao, X., and Li, X.J.F.i.M., *Induction of UPR Promotes Interferon Response to Inhibit PRRSV Replication via PKR and NF- κ B Pathway*. 2021: p. 2995.
389. Brockmeier, S.L., Loving, C.L., Eberle, K.C., Hau, S.J., Buckley, A., Van Geelen, A., Montiel, N.A., Nicholson, T., and 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**: p. 48-51.
390. Patel, D., Nan, Y., Shen, M., Ritthipichai, K., Zhu, X., and Zhang, Y.J., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation*. J Virol, 2010. **84**(21): p. 11045-55.
391. Luo, R., Xiao, S., Jiang, Y., Jin, H., Wang, D., Liu, M., Chen, H., and Fang, L., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses interferon-beta*

- production by interfering with the RIG-I signaling pathway.* Mol Immunol, 2008. **45**(10): p. 2839-46.
392. Ke, H. and Yoo, D., *The viral innate immune antagonism and an alternative vaccine design for PRRS virus.* Veterinary microbiology, 2017. **209**: p. 75-89.
393. Sun, Z., Li, Y., Ransburgh, R., Snijder, E.J., and Fang, Y., *Nonstructural protein 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits the antiviral function of interferon-stimulated gene 15.* J Virol, 2012. **86**(7): p. 3839-50.
394. Yang, L. and Zhang, Y.J., *Antagonizing cytokine-mediated JAK-STAT signaling by porcine reproductive and respiratory syndrome virus.* Vet Microbiol, 2017. **209**: p. 57-65.
395. Beura, L.K., Sarkar, S.N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A.K., and Osorio, F.A., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation.* J Virol, 2010. **84**(3): p. 1574-84.
396. Shi, X., Wang, L., Li, X., Zhang, G., Guo, J., Zhao, D., Chai, S., and Deng, R., *Endoribonuclease activities of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp11 was essential for nsp11 to inhibit IFN-beta induction.* Mol Immunol, 2011. **48**(12-13): p. 1568-72.
397. Sun, Z., Chen, Z., Lawson, S.R., and Fang, Y., *The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and interferon antagonism functions.* J Virol, 2010. **84**(15): p. 7832-46.
398. Darwich, L., Diaz, I., and Mateu, E., *Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology.* Virus Res, 2010. **154**(1-2): p. 123-32.
399. Cancel-Tirado, S.M., Evans, R.B., and Yoon, K.J., *Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection.* Vet Immunol Immunopathol, 2004. **102**(3): p. 249-62.
400. Yoon, K.J., Wu, L.L., Zimmerman, J.J., Hill, H.T., and Platt, K.B., *Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs.* Viral Immunol, 1996. **9**(1): p. 51-63.
401. Rahe, M.C. and Murtaugh, M.P., *Effector mechanisms of humoral immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus.* Vet Immunol Immunopathol, 2017. **186**: p. 15-18.
402. Rahe, M.C. and Murtaugh, M.P., *Mechanisms of Adaptive Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.* Viruses, 2017. **9**(6).
403. Lopez, O.J., Oliveira, M.F., Garcia, E.A., Kwon, B.J., Doster, A., and Osorio, F.A., *Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent.* Clin Vaccine Immunol, 2007. **14**(3): p. 269-75.
404. Meier, W., Wheeler, J., Husmann, R., Osorio, F., and Zuckermann, F., *Characteristics of the immune response of pigs to PRRS virus [porcine reproductive and respiratory syndrome].* Veterinary Research, 2000.

405. Yoon, I.J., Joo, H.S., Goyal, S.M., and Molitor, T.W., *A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera*. J Vet Diagn Invest, 1994. **6**(3): p. 289-92.
406. Costers, S., Lefebvre, D.J., Van Doorselaere, J., Vanhee, M., Delputte, P.L., and Nauwynck, H.J., *GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralizing epitope that is susceptible to immunoselection in vitro*. Arch Virol, 2010. **155**(3): p. 371-8.
407. Vanhee, M., Costers, S., Van Breedam, W., Geldhof, M.F., Van Doorselaere, J., and Nauwynck, H.J., *A variable region in GP4 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces neutralizing antibodies against homologous but not heterologous virus strains*. Viral Immunol, 2010. **23**(4): p. 403-13.
408. Zhou, L., Ni, Y.Y., Pineyro, P., Sanford, B.J., Cossaboom, C.M., Dryman, B.A., Huang, Y.W., Cao, D.J., and Meng, X.J., *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, 2012. **434**(1): p. 96-109.
409. Plagemann, P.G., *Neutralizing antibody formation in swine infected with seven strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as measured by indirect ELISA with peptides containing the GP5 neutralization epitope*. Viral Immunol, 2006. **19**(2): p. 285-93.
410. Young, J.E., Dvorak, C.M.T., Graham, S.P., and Murtaugh, M.P., *Isolation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5-Specific, Neutralizing Monoclonal Antibodies From Hyperimmune Sows*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 638493.
411. Weiland, E., Wieczorek-Krohmer, M., Kohl, D., Conzelmann, K.K., and Weiland, F., *Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4*. Vet Microbiol, 1999. **66**(3): p. 171-86.
412. Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., and Zuckermann, F.A., *Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination*. Virology, 2003. **309**(1): p. 18-31.
413. Vashisht, K., Goldberg, T.L., Husmann, R.J., Schnitzlein, W., and Zuckermann, F.A., *Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Vaccine, 2008. **26**(36): p. 4747-53.
414. Bautista, E.M., Suarez, P., and Molitor, T.W., *T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Arch Virol, 1999. **144**(1): p. 117-34.
415. Jeong, H.J., Song, Y.J., Lee, S.W., Lee, J.B., Park, S.Y., Song, C.S., Ha, G.W., Oh, J.S., Oh, Y.K., and Choi, I.S., *Comparative measurement of cell-mediated immune responses of swine to the M and N proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(4): p. 503-12.
416. Mokhtar, H., Eck, M., Morgan, S.B., Essler, S.E., Frossard, J.P., Ruggli, N., and Graham, S.P., *Proteome-wide screening of the European porcine reproductive and respiratory*

- syndrome virus reveals a broad range of T cell antigen reactivity.* Vaccine, 2014. **32**(50): p. 6828-37.
417. Diaz, I., Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., and Mateu, E., *In silico prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype-1 (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.* Vaccine, 2009. **27**(41): p. 5603-11.
418. Rowland, R.R. and Morrison, R.B., *Challenges and opportunities for the control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.* Transbound Emerg Dis, 2012. **59 Suppl 1**: p. 55-9.
419. Corzo, C.A., Mondaca, E., Wayne, S., Torremorell, M., Dee, S., Davies, P., and Morrison, R.B., *Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.* Virus Res, 2010. **154**(1-2): p. 185-92.
420. Dee, S., Collins, J., Halbur, P., Keffaber, K., Lautner, B., McCaw, M., Poison, D., Rodibaugh, M., Sanford, E., Yeske, P., and Production, *Control of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus.* Journal of Swine Health, 1996. **4**(2): p. 95-98.
421. Nan, Y., Wu, C., Gu, G., Sun, W., Zhang, Y.-J., and Zhou, E.-M., *Improved vaccine against PRRSV: current progress and future perspective.* Frontiers in microbiology, 2017. **8**: p. 1635.
422. Linhares, D.C., Cano, J.P., Wetzell, T., Nerem, J., Torremorell, M., and Dee, S.A., *Effect of modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) vaccine on the shedding of wild-type virus from an infected population of growing pigs.* Vaccine, 2012. **30**(2): p. 407-13.
423. Pileri, E., Gibert, E., Soldevila, F., Garcia-Saenz, A., Pujols, J., Diaz, I., Darwich, L., Casal, J., Martin, M., and Mateu, E., *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.* Vet Microbiol, 2015. **175**(1): p. 7-16.
424. Zhou, L., Ge, X., and Yang, H., *Porcine reproductive and respiratory syndrome modified live virus vaccine: a "leaky" vaccine with debatable efficacy and safety.* Vaccines, 2021. **9**(4): p. 362.
425. Kvisgaard, L.K., Kristensen, C.S., Ryt-Hansen, P., Pedersen, K., Stadejek, T., Trebbien, R., Andresen, L.O., and Larsen, L.E., *A recombination between two Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) vaccine strains has caused severe outbreaks in Danish pigs.* Transbound Emerg Dis, 2020.
426. Eclercy, J., Renson, P., Lebret, A., Hirchaud, E., Normand, V., Andraud, M., Paboeuf, F., Blanchard, Y., Rose, N., and Bourry, O., *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, 2019. **11**(3).
427. Renson, P., Touzain, F., Lebret, A., Le Dimna, M., Quenault, H., Normand, V., Claude, J.B., Pez, F., Rose, N., Blanchard, Y., and Bourry, O., *Complete Genome Sequence of a Recombinant Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain from Two Genotype 1 Modified Live Virus Vaccine Strains.* Genome Announc, 2017. **5**(22).
428. Scotti, M., Prieto, C., Simarro, I., and Castro, J.M., *Reproductive performance of gilts following vaccination and subsequent heterologous challenge with European strains of*

- porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Theriogenology, 2006. **66**(8): p. 1884-93.
429. Charentantanakul, W., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects*. World J Virol, 2012. **1**(1): p. 23-30.
430. Park, S.J., Seo, H.W., Park, C., and Chae, C., *Interaction between single-dose Mycoplasma hyopneumoniae and porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines on dually infected pigs*. Res Vet Sci, 2014. **96**(3): p. 516-22.
431. Opriessnig, T., McKeown, N.E., Harmon, K.L., Meng, X.J., and Halbur, P.G., *Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(8): p. 923-9.
432. Rathkjen, P.H. and Dall, J., *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, 2017. **59**(1): p. 4.
433. Lunney, J.K. and Chen, H., *Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection*. Virus Res, 2010. **154**(1-2): p. 161-9.
434. Chen, J., Wang, H., Bai, J., Liu, W., Liu, X., Yu, D., Feng, T., Sun, Z., Zhang, L., Ma, L., Hu, Y., Zou, Y., Tan, T., Zhong, J., Hu, M., Bai, X., Pan, D., Xing, Y., Zhao, Y., Tian, K., Hu, X., and Li, N., *Generation of Pigs Resistant to Highly Pathogenic-Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus through Gene Editing of CD163*. Int J Biol Sci, 2019. **15**(2): p. 481-492.
435. Whitworth, K.M., Lee, K., Benne, J.A., Beaton, B.P., Spate, L.D., Murphy, S.L., Samuel, M.S., Mao, J., O'Gorman, C., and Walters, E.M., *Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos*. Biology of reproduction, 2014. **91**(3): p. 78, 1-13.
436. Whitworth, K.M., Rowland, R.R., Ewen, C.L., Tribble, B.R., Kerrigan, M.A., Cino-Ozuna, A.G., Samuel, M.S., Lightner, J.E., McLaren, D.G., and Mileham, A.J., *Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Nature biotechnology, 2016. **34**(1): p. 20-22.
437. Xu, K., Zhou, Y., Mu, Y., Liu, Z., Hou, S., Xiong, Y., Fang, L., Ge, C., Wei, Y., and Zhang, X., *CD163 and pAPN double-knockout pigs are resistant to PRRSV and TGEV and exhibit decreased susceptibility to PDCoV while maintaining normal production performance*. Elife, 2020. **9**: p. e57132.
438. Petersen, G.E.L., Buntjer, J.B., Hely, F.S., Byrne, T.J., and Doeschl-Wilson, A., *Modeling suggests gene editing combined with vaccination could eliminate a persistent disease in livestock*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2022. **119**(9): p. e2107224119.
439. Koen, J., *A practical method for field diagnosis of swine disease*. Am J Vet Med, 1919. **14**: p. 468-470.
440. Potter, C.W., *A history of influenza*. Journal of applied microbiology, 2001. **91**(4): p. 572-579.
441. Shope, R.E., *Swine influenza: I. Experimental transmission and pathology*. The Journal of experimental medicine, 1931. **54**(3): p. 349-359.

442. Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Janke, B.H., and Richt, J.A., *Swine influenza viruses: a North American perspective*. *Advances in virus research*, 2008. **72**: p. 127-154.
443. Chambers, T., Hinshaw, V.S., Kawaoka, Y., Easterday, B., and Webster, R., *Influenza viral infection of swine in the United States 1988–1989*. *Archives of virology*, 1991. **116**: p. 261-265.
444. Arora, D., N’Diaye, M., and Dea, S., *Genomic study of hemagglutinins of swine influenza (H1N1) viruses associated with acute and chronic respiratory diseases in pigs*. *Archives of virology*, 1997. **142**: p. 401-412.
445. Bikour, M.H., Frost, E.H., Deslandes, S., Talbot, B., Weber, J.M., and Elazhary, Y., *Recent H3N2 swine influenza virus with haemagglutinin and nucleoprotein genes similar to 1975 human strains*. *Journal of General Virology*, 1995. **76**(3): p. 697-703.
446. Webby, R.J., Swenson, S.L., Krauss, S.L., Gerrish, P.J., Goyal, S.M., and Webster, R.G., *Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States*. *Journal of virology*, 2000. **74**(18): p. 8243-8251.
447. Zhou, N.N., Senne, D.A., Landgraf, J.S., Swenson, S.L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K.-j., Krauss, S., and Webster, R.G., *Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs*. *Journal of virology*, 1999. **73**(10): p. 8851-8856.
448. Olsen, C.W., Karasin, A.I., Carman, S., Li, Y., Bastien, N., Ojkic, D., Alves, D., Charbonneau, G., Henning, B.M., and Low, D.E., *Triple reassortant H3N2 influenza A viruses, Canada, 2005*. *Emerging infectious diseases*, 2006. **12**(7): p. 1132.
449. Parys, A., Vandoorn, E., King, J., Graaf, A., Pohlmann, A., Beer, M., Harder, T., and Van Reeth, K., *Human infection with Eurasian avian-like swine influenza A (H1N1) virus, the Netherlands, September 2019*. *Emerging Infectious Diseases*, 2021. **27**(3): p. 939.
450. Hennig, C., Graaf, A., Petric, P.P., Graf, L., Schwemmler, M., Beer, M., and Harder, T., *Are pigs overestimated as a source of zoonotic influenza viruses?* *Porcine Health Management*, 2022. **8**(1): p. 1-12.
451. Fobian, K., Fabrizio, T.P., Yoon, S.-W., Hansen, M.S., Webby, R.J., and Larsen, L.E., *New reassortant and enzootic European swine influenza viruses transmit efficiently through direct contact in the ferret model*. *The Journal of general virology*, 2015. **96**(Pt 7): p. 1603.
452. Mena, I., Nelson, M.I., Quezada-Monroy, F., Dutta, J., Cortes-Fernández, R., Lara-Puente, J.H., Castro-Peralta, F., Cunha, L.F., Trovão, N.S., and Lozano-Dubernard, B., *Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico*. *Elife*, 2016. **5**: p. e16777.
453. Al Hajjar, S. and McIntosh, K., *The first influenza pandemic of the 21st century*. *Annals of Saudi medicine*, 2010. **30**(1): p. 1-10.
454. Dawood, F.S., Iuliano, A.D., Reed, C., Meltzer, M.I., Shay, D.K., Cheng, P.-Y., Bandaranayake, D., Breiman, R.F., Brooks, W.A., and Buchy, P., *Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study*. *The Lancet infectious diseases*, 2012. **12**(9): p. 687-695.
455. Garten, R.J., Davis, C.T., Russell, C.A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W.M., Xu, X., Skepner, E., and Deyde, V., *Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans*. *Science*, 2009. **325**(5937): p. 197-201.

456. Smith, G.J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, C.L., Raghwani, J., and Bhatt, S., *Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic*. *Nature*, 2009. **459**(7250): p. 1122-1125.
457. Jilani, T.N., Jamil, R.T., and Siddiqui, A.H., *H1N1 Influenza*, in *StatPearls*. 2023, StatPearls Publishing

Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

458. Keenlside, J., *Pandemic influenza A H1N1 in Swine and other animals*. *Swine Influenza*, 2013: p. 259-271.
459. Howden, K.J., Brockhoff, E.J., Caya, F.D., McLeod, L.J., Lavoie, M., Ing, J.D., Bystrom, J.M., Alexandersen, S., Pasick, J.M., and Berhane, Y., *An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm*. *The Canadian veterinary journal*, 2009. **50**(11): p. 1153.
460. Forgie, S.E., Keenlside, J., Wilkinson, C., Webby, R., Lu, P., Sorensen, O., Fonseca, K., Barman, S., Rubrum, A., and Stigger, E., *Swine outbreak of pandemic influenza A virus on a Canadian research farm supports human-to-swine transmission*. *Clinical Infectious Diseases*, 2011. **52**(1): p. 10-18.
461. Pasma, T. and Joseph, T., *Pandemic (H1N1) 2009 infection in swine herds, Manitoba, Canada*. *Emerging infectious diseases*, 2010. **16**(4): p. 706.
462. Nfon, C.K., Berhane, Y., Hisanaga, T., Zhang, S., Handel, K., Kehler, H., Labrecque, O., Lewis, N.S., Vincent, A.L., and Copps, J., *Characterization of H1N1 swine influenza viruses circulating in Canadian pigs in 2009*. *Journal of virology*, 2011. **85**(17): p. 8667-8679.
463. Ferguson, L., Luo, K., Olivier, A.K., Cunningham, F.L., Blackmon, S., Hanson-Dorr, K., Sun, H., Baroch, J., Lutman, M.W., and Quade, B., *Influenza D virus infection in feral swine populations, United States*. *Emerging Infectious Diseases*, 2018. **24**(6): p. 1020.
464. Kimura, H., Abiko, C., Peng, G., Muraki, Y., Sugawara, K., Hongo, S., Kitame, F., Mizuta, K., Numazaki, Y., and Suzuki, H., *Interspecies transmission of influenza C virus between humans and pigs*. *Virus research*, 1997. **48**(1): p. 71-79.
465. Yamaoka, M., Hotta, H., Itoh, M., and Homma, M., *Prevalence of antibody to influenza C virus among pigs in Hyogo Prefecture, Japan*. *Journal of general virology*, 1991. **72**(3): p. 711-714.
466. Foni, E., Chiapponi, C., Baioni, L., Zanni, I., Merenda, M., Rosignoli, C., Kyriakis, C.S., Luini, M.V., Mandola, M.L., and Bolzoni, L., *Influenza D in Italy: towards a better understanding of an emerging viral infection in swine*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 11660.
467. Gorin, S., Fablet, C., Quéguiner, S., Barbier, N., Paboeuf, F., Hervé, S., Rose, N., and Simon, G., *Assessment of influenza D virus in domestic pigs and wild boars in France: apparent limited spread within swine populations despite serological evidence of breeding sow exposure*. *Viruses*, 2019. **12**(1): p. 25.
468. McKellar, J., Rebendenne, A., Wencker, M., Moncorgé, O., and Goujon, C., *Mammalian and avian host cell influenza A restriction factors*. *Viruses*, 2021. **13**(3): p. 522.
469. Chauhan, R.P. and Gordon, M.L., *A systematic review analyzing the prevalence and circulation of influenza viruses in swine population worldwide*. *Pathogens*, 2020. **9**(5): p. 355.

470. Bouvier, N.M. and Palese, P., *The biology of influenza viruses*. Vaccine, 2008. **26**: p. D49-D53.
471. Arranz, R., Coloma, R., Chichón, F.J., Conesa, J.J., Carrascosa, J.L., Valpuesta, J.M., Ortín, J., and Martín-Benito, J., *The structure of native influenza virion ribonucleoproteins*. Science, 2012. **338**(6114): p. 1634-1637.
472. Te Velhuis, A.J. and Fodor, E., *Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis*. Nature Reviews Microbiology, 2016. **14**(8): p. 479-493.
473. Krug, R.M., *Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs*. Initiation Signals in Viral Gene Expression, 1981: p. 125-149.
474. Kobayashi, M., Toyoda, T., and Ishihama, A., *Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase*. Archives of virology, 1996. **141**: p. 525-539.
475. Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., and Palese, P., *A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death*. Nature medicine, 2001. **7**(12): p. 1306-1312.
476. Perez, D.R. and Donis, R.O., *Functional analysis of PA binding by influenza A virus PB1: effects on polymerase activity and viral infectivity*. Journal of virology, 2001. **75**(17): p. 8127-8136.
477. Wilson, I.A., Skehel, J.J., and Wiley, D., *Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution*. Nature, 1981. **289**(5796): p. 366-373.
478. Guthmiller, J.J., Han, J., Utset, H.A., Li, L., Lan, L.Y.-L., Henry, C., Stamper, C.T., McMahon, M., O'Dell, G., and Fernández-Quintero, M.L., *Broadly neutralizing antibodies target a haemagglutinin anchor epitope*. Nature, 2022. **602**(7896): p. 314-320.
479. Prokudina, E., Semenova, N., and Chumakov, V., *Stability of intracellular influenza virus nucleocapsid protein oligomers*. Archives of virology, 2005. **150**: p. 833-839.
480. Nayak, D.P., Balogun, R.A., Yamada, H., Zhou, Z.H., and Barman, S., *Influenza virus morphogenesis and budding*. Virus research, 2009. **143**(2): p. 147-161.
481. Selzer, L., Su, Z., Pintilie, G.D., Chiu, W., and Kirkegaard, K., *Full-length three-dimensional structure of the influenza A virus M1 protein and its organization into a matrix layer*. PLoS Biology, 2020. **18**(9): p. e3000827.
482. Sakaguchi, T., *Structure and function of the influenza virus M2 ion channel protein*. Nihon rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine, 1997. **55**(10): p. 2587-2592.
483. Hale, B.G., Randall, R.E., Ortín, J., and Jackson, D., *The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses*. Journal of general virology, 2008. **89**(10): p. 2359-2376.
484. Paterson, D. and Fodor, E., *Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP)*. PLoS pathogens, 2012. **8**(12): p. e1003019.
485. Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N., and Kawaoka, Y., *Influenza virus receptors in the human airway*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 435-436.
486. Van Riel, D., Munster, V.J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., and Kuiken, T., *H5N1 virus attachment to lower respiratory tract*. Science, 2006. **312**(5772): p. 399-399.
487. Trebbien, R., Larsen, L.E., and Viuff, B.M., *Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs*. Virology journal, 2011. **8**: p. 1-14.

488. Ito, T., Couceiro, J.N.S., Kelm, S., Baum, L.G., Krauss, S., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J.C., and Webster, R.G., *Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential*. Journal of virology, 1998. **72**(9): p. 7367-7373.
489. Von Itzstein, M., *The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors*. Nature reviews Drug discovery, 2007. **6**(12): p. 967-974.
490. Chen, J., Lee, K.H., Steinhauer, D.A., Stevens, D.J., Skehel, J.J., and Wiley, D.C., *Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation*. Cell, 1998. **95**(3): p. 409-417.
491. Lazarovits, J. and Roth, M., *A single amino acid change in the cytoplasmic domain allows the influenza virus hemagglutinin to be endocytosed through coated pits*. Cell, 1988. **53**(5): p. 743-752.
492. Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., and Daniels, R., *Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement*. Frontiers in immunology, 2018: p. 1581.
493. Neumann, G., Castrucci, M.R., and Kawaoka, Y., *Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein*. Journal of virology, 1997. **71**(12): p. 9690-9700.
494. Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I., and Krug, R.M., *A unique cap (m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription*. Cell, 1981. **23**(3): p. 847-858.
495. Engelhardt, O.G., Smith, M., and Fodor, E., *Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II*. Journal of virology, 2005. **79**(9): p. 5812-5818.
496. Deng, T., Vreede, F.T., and Brownlee, G.G., *Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication*. Journal of virology, 2006. **80**(5): p. 2337-2348.
497. Pflug, A., Lukarska, M., Resa-Infante, P., Reich, S., and Cusack, S., *Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine*. Virus research, 2017. **234**: p. 103-117.
498. Deng, T., Sharps, J.L., and Brownlee, G.G., *Role of the influenza virus heterotrimeric RNA polymerase complex in the initiation of replication*. Journal of general virology, 2006. **87**(11): p. 3373-3377.
499. Bui, M., Whittaker, G., and Helenius, A., *Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins*. Journal of virology, 1996. **70**(12): p. 8391-8401.
500. Air, G.M. and Laver, W.G., *The neuraminidase of influenza virus*. Proteins: Structure, Function, Bioinformatics, 1989. **6**(4): p. 341-356.
501. Both, G.W., Sleight, M., Cox, N., and Kendal, A., *Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites*. Journal of virology, 1983. **48**(1): p. 52-60.
502. Choi, K.H., *Viral polymerases*. Viral Molecular Machines, 2011: p. 267-304.
503. Pauly, M.D., Procario, M., and Lauring, A.S., *The mutation rates and mutational bias of influenza A virus*. bioRxiv, 2017: p. 110197.

504. Parvin, J.D., Moscona, A., Pan, W., Leider, J., and Palese, P., *Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1*. Journal of virology, 1986. **59**(2): p. 377-383.
505. Singh, K., Mehta, D., Dumka, S., Chauhan, A.S., and Kumar, S., *Quasispecies Nature of RNA Viruses: Lessons from the Past*. Vaccines, 2023. **11**(2): p. 308.
506. Barbezange, C., Jones, L., Blanc, H., Isakov, O., Celniker, G., Enouf, V., Shomron, N., Vignuzzi, M., and Van der Werf, S., *Seasonal genetic drift of human influenza A virus quasispecies revealed by deep sequencing*. Frontiers in microbiology, 2018. **9**: p. 2596.
507. Chepkwony, S., Parys, A., Vandoor, E., Stadejek, W., Xie, J., King, J., Graaf, A., Pohlmann, A., Beer, M., and Harder, T., *Genetic and antigenic evolution of H1 swine influenza A viruses isolated in Belgium and the Netherlands from 2014 through 2019*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 1-12.
508. Ryt-Hansen, P., Pedersen, A.G., Larsen, I., Kristensen, C.S., Krog, J.S., Wacheck, S., and Larsen, L.E., *Substantial antigenic drift in the hemagglutinin protein of swine influenza A viruses*. Viruses, 2020. **12**(2): p. 248.
509. Kim, H., Webster, R.G., and Webby, R.J., *Influenza virus: dealing with a drifting and shifting pathogen*. Viral immunology, 2018. **31**(2): p. 174-183.
510. Steel, J. and Lowen, A.C., *Influenza A virus reassortment*. Influenza Pathogenesis Control-Volume I, 2014: p. 377-401.
511. Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y., *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Microbiological reviews, 1992. **56**(1): p. 152-179.
512. Yoon, S.-W., Webby, R.J., and Webster, R.G., *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Influenza pathogenesis control-volume I, 2014: p. 359-375.
513. Ryt-Hansen, P., Krog, J.S., Breum, S.Ø., Hjulsgaard, C.K., Pedersen, A.G., Trebbien, R., and Larsen, L.E., *Co-circulation of multiple influenza A reassortants in swine harboring genes from seasonal human and swine influenza viruses*. Elife, 2021. **10**: p. e60940.
514. Yang, J.-R., Kuo, C.-Y., Yu, I.-L., Kung, F.-Y., Wu, F.-T., Lin, J.-S., and Liu, M.-T., *Human infection with a reassortant swine-origin influenza A (H1N2) v virus in Taiwan, 2021*. Virology Journal, 2022. **19**(1): p. 63.
515. Ma, W., Kahn, R.E., and Richt, J.A., *The pig as a mixing vessel for influenza viruses: human and veterinary implications*. Journal of molecular genetic medicine: an international journal of biomedical research, 2009. **3**(1): p. 158.
516. Jung, K., Ha, Y., and Chae, C., *Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs*. Journal of comparative pathology, 2005. **132**(2-3): p. 179-184.
517. Khatri, M., Dwivedi, V., Krakowka, S., Manickam, C., Ali, A., Wang, L., Qin, Z., Renukaradhya, G.J., and Lee, C.-W., *Swine influenza H1N1 virus induces acute inflammatory immune responses in pig lungs: a potential animal model for human H1N1 influenza virus*. Journal of virology, 2010. **84**(21): p. 11210-11218.
518. Waithman, J. and Mintern, J.D., *Dendritic cells and influenza A virus infection*. Virulence, 2012. **3**(7): p. 603-608.
519. Zhang, J. and Gauger, P.C., *Isolation of swine influenza virus in cell cultures and embryonated chicken eggs*. Animal influenza virus, 2014: p. 265-276.

520. Frank, A.L., Couch, R., Griffis, C., and Baxter, B., *Comparison of different tissue cultures for isolation and quantitation of influenza and parainfluenza viruses*. Journal of clinical microbiology, 1979. **10**(1): p. 32-36.
521. Govorkova, E., Matrosovich, M., Tuzikov, A., Bovin, N., Gerdil, C., Fanget, B., and Webster, R., *Selection of receptor-binding variants of human influenza A and B viruses in baby hamster kidney cells*. Archives of virology, 1999. **262**(1): p. 31-38.
522. Reina, J., Fernandez-Baca, V., Blanco, I., and Munar, M., *Comparison of Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) with a green monkey continuous cell line (Vero) and human lung embryonated cells (MRC-5) in the isolation of influenza A virus from nasopharyngeal aspirates by shell vial culture*. Journal of clinical microbiology, 1997. **35**(7): p. 1900-1901.
523. Wang, T.-E., Chao, T.-L., Tsai, H.-T., Lin, P.-H., Tsai, Y.-L., and Chang, S.-Y., *Differentiation of Cytopathic Effects (CPE) induced by influenza virus infection using deep Convolutional Neural Networks (CNN)*. PLoS Computational Biology, 2020. **16**(5): p. e1007883.
524. Brookes, S.M., Núñez, A., Choudhury, B., Matrosovich, M., Essen, S.C., Clifford, D., Slomka, M.J., Kuntz-Simon, G., Garcon, F., and Nash, B., *Replication, pathogenesis and transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus in non-immune pigs*. PloS one, 2010. **5**(2): p. e9068.
525. Janke, B., *Influenza A virus infections in swine: pathogenesis and diagnosis*. Veterinary pathology, 2014. **51**(2): p. 410-426.
526. Detmer, S., Gramer, M., Goyal, S., Torremorell, M., and Torrison, J., *Diagnostics and surveillance for swine influenza*. Swine Influenza, 2013: p. 85-112.
527. McQueen, J., Steele, J., and Robinson, R., *Influenza in animals*. Advances in veterinary science, 1968. **12**: p. 285-336.
528. Simon-Grifé, M., Martín-Valls, G.E., Vilar, M.J., Busquets, N., Mora-Salvatierra, M., Bestebroer, T.M., Fouchier, R.A., Martín, M., Mateu, E., and Casal, J., *Swine influenza virus infection dynamics in two pig farms; results of a longitudinal assessment*. Veterinary research, 2012. **43**(1): p. 1-11.
529. Van Reeth, K., Van Gucht, S., and Pensaert, M., *Correlations between lung proinflammatory cytokine levels, virus replication, and disease after swine influenza virus challenge of vaccination-immune pigs*. Viral immunology, 2002. **15**(4): p. 583-594.
530. Sreta, D., Kedkovid, R., Tuamsang, S., Kitikoon, P., and Thanawongnuwech, R., *Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial*. Virology journal, 2009. **6**: p. 1-11.
531. Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Stevenson, G.W., and Schwartz, K.J., *Diseases of swine*. 2012: John Wiley & Sons.
532. Katze, M., *Into the eye of the cytokine storm*. Microbiol Mol Biol Rev, 2012. **76**(1): p. 16-32.
533. Bowman, A.S., Nolting, J.M., Nelson, S.W., and Slemmons, R.D., *Subclinical influenza virus A infections in pigs exhibited at agricultural fairs, Ohio, USA, 2009–2011*. Emerging infectious diseases, 2012. **18**(12): p. 1945.
534. *USDA's National Surveillance Plan for Swine Influenza Virus in Pigs*. 2010, U.S. Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service Veterinary Services.

535. Spickler, A.R., *Swine Influenza*. Retrieved from <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>. 2022.
536. Kwit, K., Pomorska-Mól, M., and Markowska-Daniel, I., *The influence of experimental infection of gilts with swine H1N2 influenza A virus during the second month of gestation on the course of pregnancy, reproduction parameters and clinical status*. BMC veterinary research, 2014. **10**(1): p. 1-12.
537. Gumbert, S., Froehlich, S., Rieger, A., Stadler, J., Ritzmann, M., and Zoels, S., *Reproductive performance of pandemic influenza A virus infected sow herds before and after implementation of a vaccine against the influenza A (H1N1) pdm09 virus*. Porcine health management, 2020. **6**(1): p. 1-9.
538. Crisci, E., Mussá, T., Fraile, L., and Montoya, M., *Influenza virus in pigs*. Molecular immunology, 2013. **55**(3-4): p. 200-211.
539. Pomorska-Mól, M., Markowska-Daniel, I., Kwit, K., Czyżewska, E., Dors, A., Rachubik, J., and Pejsak, Z., *Immune and inflammatory response in pigs during acute influenza caused by H1N1 swine influenza virus*. Archives of virology, 2014. **159**: p. 2605-2614.
540. Turlewicz-Podbielska, H., Czyżewska-Dors, E., and Pomorska-Mól, M., *Respiratory viral infections drive different lung cytokine profiles in pigs*. BMC veterinary research, 2021. **17**(1): p. 1-8.
541. Dobrescu, I., Levast, B., Lai, K., Delgado-Ortega, M., Walker, S., Banman, S., Townsend, H., Simon, G., Zhou, Y., and Gerdts, V., *In vitro and ex vivo analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses*. Veterinary microbiology, 2014. **169**(1-2): p. 18-32.
542. Gaur, P., Munjal, A., and Lal, S.K., *Influenza virus and cell signaling pathways*. Medical science monitor: international medical journal of experimental clinical research 2011. **17**(6): p. RA148.
543. Zhang, B., Liu, M., Huang, J., Zeng, Q., Zhu, Q., Xu, S., and Chen, H., *H1N1 Influenza A Virus Protein NS2 Inhibits Innate Immune Response by Targeting IRF7*. Viruses, 2022. **14**(11): p. 2411.
544. Ji, Z.-x., Wang, X.-q., and Liu, X.-f., *NS1: a Key protein in the “game” between influenza A virus and host in innate immunity*. Frontiers in Cellular Infection Microbiology, 2021. **11**: p. 670177.
545. Kochs, G., García-Sastre, A., and Martínez-Sobrido, L., *Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein*. Journal of virology, 2007. **81**(13): p. 7011-7021.
546. Hu, Y., Pan, Q., Zhou, K., Ling, Y., Wang, H., and Li, Y., *RUNX1 inhibits the antiviral immune response against influenza A virus through attenuating type I interferon signaling*. Virology Journal, 2022. **19**(1): p. 1-14.
547. Gack, M.U., Albrecht, R.A., Urano, T., Inn, K.-S., Huang, I.-C., Carnero, E., Farzan, M., Inoue, S., Jung, J.U., and García-Sastre, A., *Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I*. Cell host microbe, 2009. **5**(5): p. 439-449.
548. Sharma, K., Tripathi, S., Ranjan, P., Kumar, P., Garten, R., Deyde, V., Katz, J.M., Cox, N.J., Lal, R.B., and Sambhara, S., *Influenza A virus nucleoprotein exploits Hsp40 to inhibit PKR activation*. PloS one, 2011. **6**(6): p. e20215.

549. Varga, Z.T., Ramos, I., Hai, R., Schmolke, M., García-Sastre, A., Fernandez-Sesma, A., and Palese, P., *The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein*. PLoS pathogens, 2011. **7**(6): p. e1002067.
550. Graef, K.M., Vreede, F.T., Lau, Y.-F., McCall, A.W., Carr, S.M., Subbarao, K., and Fodor, E., *The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon*. Journal of virology, 2010. **84**(17): p. 8433-8445.
551. Jia, D., Rahbar, R., Chan, R.W., Lee, S.M., Chan, M.C., Wang, B.X., Baker, D.P., Sun, B., Peiris, J.M., and Nicholls, J.M., *Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling*. PloS one, 2010. **5**(11): p. e13927.
552. Van de Sandt, C.E., Kreijtz, J.H., and Rimmelzwaan, G.F., *Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses*. Viruses, 2012. **4**(9): p. 1438-1476.
553. Gonzalez, S.F., Jayasekera, J.P., and Carroll, M.C., *Complement and natural antibody are required in the long-term memory response to influenza virus*. Vaccine, 2008. **26**: p. 186-193.
554. Lee, B.W., Bey, R.F., Baarsch, M.J., and Larson, M.E., *Class specific antibody response to influenza A H1N1 infection in swine*. Veterinary microbiology, 1995. **43**(2-3): p. 241-250.
555. Juárez-Ramírez, M., Sánchez-Betancourt, I., Trujillo-Ortega, M.E., Mendoza-Elvira, S., Carreón-Nápoles, R., Fuente-Martínez, B., and Trigo-Tavera, F.J., *Clinical evaluation, serological response and lesions generated by the A/Mexico/La Gloria-3/2009/H1N1 and A/swine/New Jersey/11/1976/H1N1 influenza viruses in colostrated and non-colostrated pigs*. Virusdisease, 2019. **30**: p. 433-440.
556. Kitikoon, P., Nilubol, D., Erickson, B.J., Janke, B.H., Hoover, T.C., Sornsen, S.A., and Thacker, E.L., *The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination*. Veterinary immunology immunopathology, 2006. **112**(3-4): p. 117-128.
557. Heinen, P.P., de Boer-Luijtz, E.A., and Bianchi, A.T., *Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection*. Journal of General Virology, 2001. **82**(11): p. 2697-2707.
558. Sinkora, M., Butler, J.E., Lager, K.M., Potockova, H., and Sinkorova, J., *The comparative profile of lymphoid cells and the T and B cell spectratype of germ-free piglets infected with viruses SIV, PRRSV or PCV2*. Veterinary research, 2014. **45**: p. 1-18.
559. Edmans, M., McNee, A., Porter, E., Vatzia, E., Paudyal, B., Martini, V., Gubbins, S., Francis, O., Harley, R., and Thomas, A., *Magnitude and kinetics of T cell and antibody responses during H1N1pdm09 infection in inbred babraham pigs and outbred pigs*. Frontiers in Immunology, 2021. **11**: p. 604913.
560. Heinen, P., Van Nieuwstadt, A., de Boer-Luijtz, E., and Bianchi, A., *Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus*. Veterinary immunology immunopathology, 2001. **82**(1-2): p. 39-56.
561. *Swine influenza*. World Organisation for Animal Health, accessed in 2023 at <https://www.woah.org/en/disease/swine-influenza/>.
562. Chamba Pardo, F., *Influenza A virus epidemiology in breed-to-wean farms and infection dynamics in nursery pigs*. 2018.

563. Mastin, A., Alarcon, P., Pfeiffer, D., Wood, J., Williamson, S., Brown, I., Wieland, B., and Consortium, C., *Prevalence and risk factors for swine influenza virus infection in the English pig population*. PLoS currents, 2011. **3**.
564. Mancera Gracia, J.C., Pearce, D.S., Masic, A., and Balasch, M., *Influenza A virus in swine: epidemiology, challenges and vaccination strategies*. Frontiers in Veterinary Science, 2020. **7**: p. 647.
565. Van Reeth, K., Mancera Gracia, J.C., Trus, I., Sys, L., Claes, G., Versnaeyen, H., Cox, E., Krammer, F., and Qiu, Y., *Heterologous prime-boost vaccination with H3N2 influenza viruses of swine favors cross-clade antibody responses and protection*. Vaccines, 2017. **2**(1): p. 11.
566. Ma, W. and Richt, J.A., *Swine influenza vaccines: current status and future perspectives*. Animal health research reviews, 2010. **11**(1): p. 81-96.
567. Rahn, J., Hoffmann, D., Harder, T., and Beer, M., *Vaccines against influenza A viruses in poultry and swine: Status and future developments*. Vaccine, 2015. **33**(21): p. 2414-2424.
568. Bosworth, B., Erdman, M., Stine, D., Harris, I., Irwin, C., Jens, M., Loynachan, A., Kamrud, K., and Harris, D., *Replicon particle vaccine protects swine against influenza*. Comparative immunology, microbiology infectious diseases, 2010. **33**(6): p. e99-e103.
569. *Évaluation environnementale des produits sur ordonnance contenant des particules d'ARN de Merck Animal Health pour l'influenza porcine et d'autres agents pathogènes*. Centre canadien des produits biologiques vétérinaires (CCPBV), agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA), 2018.
570. Quan, F.-S., Compans, R.W., Nguyen, H.H., and Kang, S.-M., *Induction of heterosubtypic immunity to influenza virus by intranasal immunization*. Journal of virology, 2008. **82**(3): p. 1350-1359.
571. Sandbulte, M.R., Platt, R., Roth, J.A., Henningson, J.N., Gibson, K.A., Rajão, D.S., Loving, C.L., and Vincent, A.L., *Divergent immune responses and disease outcomes in piglets immunized with inactivated and attenuated H3N2 swine influenza vaccines in the presence of maternally-derived antibodies*. Virology, 2014. **464**: p. 45-54.
572. 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., and García-Sastre, A., *Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease*. Journal of virology, 2012. **86**(19): p. 10597-10605.
573. Khurana, S., Loving, C.L., Manischewitz, J., King, L.R., Gauger, P.C., Henningson, J., Vincent, A.L., and Golding, H., *Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease*. Science translational medicine, 2013. **5**(200): p. 200ra114-200ra114.
574. Sharma, A., Zeller, M.A., Li, G., Harmon, K.M., Zhang, J., Hoang, H., Anderson, T.K., Vincent, A.L., and Gauger, P.C., *Detection of live attenuated influenza vaccine virus and evidence of reassortment in the US swine population*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2020. **32**(2): p. 301-311.
575. *Introducing Ingelvac Provenza™—the birth of a new generation in swine protection*. Boehringer Ingelheim International GmbH, 2010-2021. <https://www.boehringer->

[ingelheim.com/us/press-release/introducing-ingelvac-provenzatm-birth-new-generation-swine-protection](https://www.ingelheim.com/us/press-release/introducing-ingelvac-provenzatm-birth-new-generation-swine-protection).

576. Kaiser, T.J., Smiley, R.A., Fergen, B., Eichmeyer, M., and Genzow, M., *Influenza A virus shedding reduction observed at 12 weeks post-vaccination when newborn pigs are administered live-attenuated influenza virus vaccine*. *Influenza and other Respiratory Viruses*, 2019. **13**(3): p. 274-278.
577. Genzow, M., Goodell, C., Kaiser, T.J., Johnson, W., and Eichmeyer, M., *Live attenuated influenza virus vaccine reduces virus shedding of newborn piglets in the presence of maternal antibody*. *Influenza and other Respiratory Viruses*, 2018. **12**(3): p. 353-359.
578. Bragstad, K., Vinner, L., Hansen, M.S., Nielsen, J., and Fomsgaard, A., *A polyvalent influenza A DNA vaccine induces heterologous immunity and protects pigs against pandemic A (H1N1) pdm09 virus infection*. *Vaccine*, 2013. **31**(18): p. 2281-2288.
579. Sisteré-Oró, M., López-Serrano, S., Veljkovic, V., Pina-Pedrero, S., Vergara-Alert, J., Córdoba, L., Pérez-Maillo, M., Pleguezuelos, P., Vidal, E., and Segalés, J., *DNA vaccine based on conserved HA-peptides induces strong immune response and rapidly clears influenza virus infection from vaccinated pigs*. *PLoS One*, 2019. **14**(9): p. e0222201.
580. Wei, H., Lenz, S.D., Thompson, D.H., and Pogradichniy, R.M., *DNA-vaccine platform development against H1N1 subtype of swine influenza A viruses*. *Viral immunology*, 2012. **25**(4): p. 297-305.
581. Zhuang, X., Qi, Y., Wang, M., Yu, N., Nan, F., Zhang, H., Tian, M., Li, C., Lu, H., and Jin, N., *mRNA vaccines encoding the HA protein of influenza A H1N1 virus delivered by cationic lipid nanoparticles induce protective immune responses in mice*. *Vaccines*, 2020. **8**(1): p. 123.
582. Rcheulishvili, N., Papukashvili, D., Liu, C., Ji, Y., He, Y., and Wang, P.G., *Promising strategy for developing mRNA-based universal influenza virus vaccine for human population, poultry, and pigs—focus on the bigger picture*. *Frontiers in Immunology*, 2022. **13**.
583. Chen, Q., *Studies on influenza virus replicon particle vaccines in pigs*. 2012, Iowa State University.
584. Brand, M.W., Anderson, T.K., Kitikoon, P., Kimble, J.B., Otis, N., Gauger, P.C., Souza, C.K., Kaplan, B., Mogler, M., and Strait, E., *Bivalent hemagglutinin and neuraminidase influenza replicon particle vaccines protect pigs against influenza a virus without causing vaccine associated enhanced respiratory disease*. *Vaccine*, 2022. **40**(38): p. 5569-5578.
585. Vergara-Alert, J., Argilagué, J.M., Busquets, N., Ballester, M., Martín-Valls, G.E., Rivas, R., Lopez-Soria, S., Solanes, D., Majo, N., and Segales, J., *Conserved synthetic peptides from the hemagglutinin of influenza viruses induce broad humoral and T-cell responses in a pig model*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e40524.
586. Shapira, M., Jibson, M., Muller, G., and Arnon, R., *Immunity and protection against influenza virus by synthetic peptide corresponding to antigenic sites of hemagglutinin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984. **81**(8): p. 2461-2465.
587. Wesley, R.D. and Lager, K.M., *Overcoming maternal antibody interference by vaccination with human adenovirus 5 recombinant viruses expressing the hemagglutinin and the nucleoprotein of swine influenza virus*. *Veterinary microbiology*, 2006. **118**(1-2): p. 67-75.

588. Lee, J., Li, Y., Li, Y., Cino-Ozuna, A.G., Duff, M., Lang, Y., Ma, J., Sunwoo, S., Richt, J.A., and Ma, W., *Bat influenza vectored NS1-truncated live vaccine protects pigs against heterologous virus challenge*. *Vaccine*, 2021. **39**(14): p. 1943-1950.
589. Joshi, L.R., Knudsen, D., Pineyro, P., Dhakal, S., Renukaradhya, G.J., and Diel, D.G., *Protective efficacy of an Orf virus-vector encoding the hemagglutinin and the nucleoprotein of influenza A virus in swine*. *Frontiers in Immunology*, 2021. **12**: p. 747574.
590. Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, B., and Magar, R., *Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia*. *Vet Pathol*, 2003. **40**(2): p. 143-8.
591. Grau-Roma, L. and Segales, J., *Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain*. *Vet Microbiol*, 2007. **119**(2-4): p. 144-51.
592. Chen, S., Li, X., Zhang, X., Niu, G., Yang, L., Ji, W., Zhang, L., and Ren, L., *PCV2 and PRV Coinfection Induces Endoplasmic Reticulum Stress via PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP and IRE1-XBP1-EDEM Pathways*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(9): p. 4479.
593. Li, X., Chen, S., Zhang, L., Niu, G., Zhang, X., Yang, L., Ji, W., and Ren, L., *Coinfection of porcine Circovirus 2 and Pseudorabies virus enhances immunosuppression and inflammation through NF- κ B, JAK/STAT, MAPK, and NLRP3 pathways*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(8): p. 4469.
594. Cui, Z., Zhou, L., Hu, X., Zhao, S., Xu, P., Li, W., Chen, J., Zhang, Y., and Xia, P., *Immune Molecules' mRNA Expression in Porcine Alveolar Macrophages Co-Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus Type 2*. *Viruses*, 2023. **15**(3): p. 777.
595. Ramamoorthy, S. and Meng, X.J., *Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox*. *Anim Health Res Rev*, 2009. **10**(1): p. 1-20.
596. Zhao, D., Yang, B., Yuan, X., Shen, C., Zhang, D., Shi, X., Zhang, T., Cui, H., Yang, J., and Chen, X., *Advanced research in porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-infection with other pathogens in swine*. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021. **8**: p. 699561.
597. Dong, V.H., Tu, P.Y., Tsai, P.C., Lin, Y.H., Chang, H.L., Kuo, T.Y., Chiou, M.T., Lin, C.N., and Chung, W.B., *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*, 2015. **101**: p. 180-6.
598. Tu, P.Y., Tsai, P.C., Lin, Y.H., Liu, P.C., Chang, H.L., Kuo, T.Y., and Chung, W.B., *Expression profile of Toll-like receptor mRNA in pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2*. *Res Vet Sci*, 2015. **98**: p. 134-41.
599. Cecere, T.E., Meng, X.J., Pelzer, K., Todd, S.M., Beach, N.M., Ni, Y.Y., and Leroith, T., *Co-infection of porcine dendritic cells with porcine circovirus type 2a (PCV2a) and genotype II porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) induces CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cells in vitro*. *Vet Microbiol*, 2012. **160**(1-2): p. 233-9.

600. Yin, S.H., Xiao, C.T., Gerber, P.F., Beach, N.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., and Opriessnig, T., *Concurrent porcine circovirus type 2a (PCV2a) or PCV2b infection increases the rate of amino acid mutations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) during serial passages in pigs*. *Virus Res*, 2013. **178**(2): p. 445-51.
601. Harms, P.A., Halbur, P.G., and Sorden, S.D., *Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection*. *Journal of Swine Health Production*, 2002. **10**(1): p. 27-30.
602. DaPalma, T., Doonan, B.P., Trager, N.M., and Kasman, L.M., *A systematic approach to virus–virus interactions*. *Virus research*, 2010. **149**(1): p. 1-9.
603. Alvarez, F., *Création d'un modèle cellulaire des voies respiratoires du porc pour étudier les effets d'une co-infection virale au virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin et au circovirus porcin*. Master thesis in Papyrus : Institutional Repository of Université de Montréal, Montréal, Canada, 2014.
604. Kumar, N., Sharma, S., Barua, S., Tripathi, B.N., and Rouse, B.T., *Virological and immunological outcomes of coinfections*. *Clinical microbiology reviews*, 2018. **31**(4): p. e00111-17.
605. Welsh, R.M. and Selin, L.K., *No one is naive: the significance of heterologous T-cell immunity*. *Nature Reviews Immunology*, 2002. **2**(6): p. 417-426.
606. Hoenen, T. and Groseth, A., *Virus–Host Cell Interactions*. *Cells*, 2022. **11**(5): p. 804.
607. Bowie, A.G. and Unterholzner, L., *Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling*. *Nature Reviews Immunology*, 2008. **8**(12): p. 911-922.
608. Kawai, T. and Akira, S., *The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition*. *International immunology*, 2009. **21**(4): p. 317-337.
609. Bermejo-Jambrina, M., Eder, J., Helgers, L.C., Hertoghs, N., Nijmeijer, B.M., Stunnenberg, M., and Geijtenbeek, T.B., *C-type lectin receptors in antiviral immunity and viral escape*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 590.
610. Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S., *Toll-like receptors*. *Annual review of immunology*, 2003. **21**(1): p. 335-376.
611. Clop, A., Huisman, A., Van As, P., Sharaf, A., Derdak, S., and Sanchez, A., *Identification of genetic variation in the swine toll-like receptors and development of a porcine TLR genotyping array*. *Genetics Selection Evolution*, 2016. **48**: p. 1-6.
612. Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G., and Choi, S., *Toll-like receptor signal transduction*. *Experimental molecular medicine*, 2007. **39**(4): p. 421-438.
613. Barton, G.M. *Viral recognition by Toll-like receptors*. in *Seminars in immunology*. 2007. Elsevier.
614. Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., and Anderson, L.J., *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus*. *Nature immunology*, 2000. **1**(5): p. 398-401.
615. Sun, Y., Ke, H., Han, M., Chen, N., Fang, W., and Yoo, D., *Nonstructural Protein 11 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Suppresses Both MAVS and RIG-I Expression as One of the Mechanisms to Antagonize Type I Interferon Production*. *PLoS One*, 2016. **11**(12): p. e0168314.

616. Wang, D., Fan, J., Fang, L., Luo, R., Ouyang, H., Ouyang, C., Zhang, H., Chen, H., Li, K., and Xiao, S., *The nonstructural protein 11 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits NF- κ B signaling by means of its deubiquitinating activity*. *Molecular Immunology*, 2015. **68**(2): p. 357-366.
617. Zhang, Q., Zhang, X., Lei, X., Wang, H., Jiang, J., Wang, Y., Bi, K., and Diao, H., *Influenza A virus NS1 protein hijacks YAP/TAZ to suppress TLR3-mediated innate immune response*. *PLoS Pathogens*, 2022. **18**(5): p. e1010505.
618. Rajsbaum, R., Albrecht, R.A., Wang, M.K., Maharaj, N.P., Versteeg, G.A., Nistal-Villán, E., García-Sastre, A., and Gack, M.U., *Species-specific inhibition of RIG-I ubiquitination and IFN induction by the influenza A virus NS1 protein*. *PLoS pathogens*, 2012. **8**(11): p. e1003059.
619. Costers, S., Lefebvre, D.J., Delputte, P.L., and Nauwynck, H.J., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages*. *Arch Virol*, 2008. **153**(8): p. 1453-65.
620. Zhirnov, O.P. and Klenk, H.-D., *Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling*. *Apoptosis*, 2007. **12**: p. 1419-1432.
621. Wei, L., Kwang, J., Wang, J., Shi, L., Yang, B., Li, Y., and Liu, J., *Porcine circovirus type 2 induces the activation of nuclear factor kappa B by I κ B α degradation*. *Virology*, 2008. **378**(1): p. 177-184.
622. Lee, S.-M. and Kleiboeker, S.B., *Porcine arterivirus activates the NF- κ B pathway through I κ B degradation*. *Virology*, 2005. **342**(1): p. 47-59.
623. Kumar, N., Xin, Z.-t., Liang, Y., Ly, H., and Liang, Y., *NF- κ B signaling differentially regulates influenza virus RNA synthesis*. *Journal of virology*, 2008. **82**(20): p. 9880-9889.
624. Flory, E., Kunz, M., Scheller, C., Jassoy, C., Stauber, R., Rapp, U.R., and Ludwig, S., *Influenza virus-induced NF- κ B-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of I κ B kinase*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(12): p. 8307-8314.
625. Wei, L., Zhu, S., Wang, J., and Liu, J., *Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway during porcine circovirus type 2 infection facilitates cell survival and viral replication*. *J Virol*, 2012. **86**(24): p. 13589-97.
626. Ni, B., Wen, L.B., Wang, R., Hao, H.P., Huan, C.C., Wang, X., Huang, L., Miao, J.F., Fan, H.J., and Mao, X., *The involvement of FAK-PI3K-AKT-Rac1 pathway in porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **458**(2): p. 392-8.
627. Wei, L. and Liu, J., *Porcine circovirus type 2 replication is impaired by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway*. *Virology*, 2009. **386**(1): p. 203-9.
628. Huo, Y., Fan, L., Yin, S., Dong, Y., Guo, X., Yang, H., and Hu, H., *Involvement of unfolded protein response, p53 and Akt in modulation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-mediated JNK activation*. *Virology*, 2013. **444**(1-2): p. 233-40.
629. Kumar, R., Khandelwal, N., Thachamvally, R., Tripathi, B.N., Barua, S., Kashyap, S.K., Maherchandani, S., and Kumar, N., *Role of MAPK/MNK1 signaling in virus replication*. *Virus research*, 2018. **253**: p. 48-61.

630. Lv, J., Jiang, Y., Feng, Q., Fan, Z., Sun, Y., Xu, P., Hou, Y., Zhang, X., Fan, Y., and Xu, X., *Porcine Circovirus Type 2 ORF5 Protein Induces Autophagy to Promote Viral Replication via the PERK-eIF2 α -ATF4 and mTOR-ERK1/2-AMPK Signaling Pathways in PK-15 Cells*. *Frontiers in Microbiology*, 2020. **11**: p. 320.
631. Sun, M.X., Huang, L., Wang, R., Yu, Y.L., Li, C., Li, P.P., Hu, X.C., Hao, H.P., Ishag, H.A., and Mao, X., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces autophagy to promote virus replication*. *Autophagy*, 2012. **8**(10): p. 1434-47.
632. Chen, Q., Fang, L., Wang, D., Wang, S., Li, P., Li, M., Luo, R., Chen, H., and Xiao, S., *Induction of autophagy enhances porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication*. *Virus Res*, 2012. **163**(2): p. 650-5.
633. Perot, B.P., Boussier, J., Yatim, N., Rossman, J.S., Ingersoll, M.A., and Albert, M.L., *Autophagy diminishes the early interferon- β response to influenza A virus resulting in differential expression of interferon-stimulated genes*. *Cell Death & Disease*, 2018. **9**(5): p. 539.
634. Danthi, P., *Viruses and the diversity of cell death*. *Annual review of virology*, 2016. **3**: p. 533-553.
635. Sun, R., Sun, S., Zhang, Y., Zhou, Y., Shan, Y., Li, X., and Fang, W., *PCV2 Induces Reactive Oxygen Species To Promote Nucleocytoplasmic Translocation of the Viral DNA Binding Protein HMGB1 To Enhance Its Replication*. *J Virol*, 2020. **94**(13).
636. Sánchez-Carvajal, J.M., Ruedas-Torres, I., Carrasco, L., Pallarés, F.J., Mateu, E., Rodríguez-Gómez, I.M., and Gómez-Laguna, J., *Activation of regulated cell death in the lung of piglets infected with virulent PRRSV-1 Lena strain occurs earlier and mediated by cleaved Caspase-8*. *Veterinary research*, 2021. **52**: p. 1-14.
637. Gui, R. and Chen, Q., *Molecular events involved in influenza A virus-induced cell death*. *Frontiers in Microbiology*, 2022. **12**: p. 797789.
638. Samir, P., Malireddi, R.S., and Kanneganti, T.-D., *The PANoptosome: a deadly protein complex driving pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis)*. *Frontiers in cellular infection microbiology*, 2020. **10**: p. 238.
639. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicologic pathology*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
640. Lossi, L., *The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis*. *Biochemical Journal*, 2022. **479**(3): p. 357-384.
641. Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D., *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. *Science*, 1997. **275**(5303): p. 1132-1136.
642. Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M., and Martin, S.J., *Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes*. *The EMBO journal*, 2004. **23**(10): p. 2134-2145.
643. Cory, S. and Adams, J.M., *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. *Nature Reviews Cancer*, 2002. **2**(9): p. 647-656.
644. Jin, Z., El-Deiry, W.S., and therapy, *Overview of cell death signaling pathways*. *Cancer biology*, 2005. **4**(2): p. 147-171.

645. Fritsch, M., Günther, S.D., Schwarzer, R., Albert, M.-C., Schorn, F., Werthenbach, J.P., Schiffmann, L.M., Stair, N., Stocks, H., and Seeger, J.M., *Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis*. *Nature*, 2019. **575**(7784): p. 683-687.
646. Vermijlen, D., Froelich, C.J., Luo, D., Suarez-Huerta, N., Robaye, B., and Wisse, E., *Perforin and granzyme B induce apoptosis in FasL-resistant colon carcinoma cells*. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2001. **50**: p. 212-217.
647. Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., and Ley, T.J., *Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells*. *Blood*, 2004. **104**(9): p. 2840-2848.
648. Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J., *Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 355-370.
649. Ziegler, U. and Groscurth, P., *Morphological features of cell death*. *Physiology*, 2004. **19**(3): p. 124-128.
650. Thomson, B.J., *Viruses and apoptosis*. *International journal of experimental pathology*, 2001. **82**(2): p. 65-76.
651. Verburg, S.G., Lelievre, R.M., Westerveld, M.J., Inkol, J.M., Sun, Y.L., and Workenhe, S.T., *Viral-mediated activation and inhibition of programmed cell death*. *PLoS Pathogens*, 2022. **18**(8): p. e1010718.
652. Ren, L., Chen, X., and Ouyang, H., *Interactions of porcine circovirus 2 with its hosts*. *Virus genes*, 2016. **52**: p. 437-444.
653. Wei, L., Zhu, S., Wang, J., and Liu, J., *Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway during porcine circovirus type 2 infection facilitates cell survival and viral replication*. *Journal of virology*, 2012. **86**(24): p. 13589-13597.
654. Li, W., Liu, S., Wang, Y., Deng, F., Yan, W., Yang, K., Chen, H., He, Q., Charreyre, C., and Audoneet, J.-C., *Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to porcine circovirus type 2*. *BMC genomics*, 2013. **14**(1): p. 1-15.
655. Lv, Q., Guo, K., Zhang, G., and Zhang, Y., *The ORF4 protein of porcine circovirus type 2 antagonizes apoptosis by stabilizing the concentration of ferritin heavy chain through physical interaction*. *Journal of General Virology*, 2016. **97**(7): p. 1636-1646.
656. Wei, L., Zhu, S., Wang, J., Zhang, C., Quan, R., Yan, X., and Liu, J., *Regulatory role of ASK1 in porcine circovirus type 2-induced apoptosis*. *Virology*, 2013. **447**(1-2): p. 285-291.
657. Zhou, Y., Qi, B., Gu, Y., Xu, F., Du, H., Li, X., and Fang, W., *Porcine Circovirus 2 Deploys PERK Pathway and GRP78 for Its Enhanced Replication in PK-15 Cells*. *Viruses*, 2016. **8**(2).
658. Ouyang, Y., Xu, L., Lv, J., Hou, Y., Fan, Z., Xu, P., Jiang, Y., Wu, M., Li, R., Zhang, Y., and Guo, K., *Porcine circovirus type 2 ORF5 protein induces endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in porcine alveolar macrophages*. *Arch Virol*, 2019. **164**(5): p. 1323-1334.
659. Fribley, A., Zhang, K., and Kaufman, R.J., *Regulation of apoptosis by the unfolded protein response*. *Apoptosis: Methods and Protocols*, Second Edition, 2009: p. 191-204.
660. Zhang, Y., Sun, R., Geng, S., Shan, Y., Li, X., and Fang, W., *Porcine Circovirus Type 2 Induces ORF3-Independent Mitochondrial Apoptosis via PERK Activation and Elevation of Cytosolic Calcium*. *J Virol*, 2019. **93**(7).

661. Wei, L., Zhu, Z., Wang, J., and Liu, J., *JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways contribute to porcine circovirus type 2 infection*. Journal of virology, 2009. **83**(12): p. 6039-6047.
662. Costers, S., Lefebvre, D.J., Delputte, P.L., and Nauwynck, H.J., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages*. Archives of virology, 2008. **153**: p. 1453-1465.
663. An, T.-Q., Li, J.-N., Su, C.-M., and Yoo, D., *Molecular and cellular mechanisms for PRRSV pathogenesis and host response to infection*. Virus research, 2020. **286**: p. 197980.
664. Lee, S.-M. and Kleiboeker, S.B., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway*. Virology, 2007. **365**(2): p. 419-434.
665. Yuan, S., Zhang, N., Xu, L., Zhou, L., Ge, X., Guo, X., and Yang, H., *Induction of apoptosis by the nonstructural protein 4 and 10 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0156518.
666. Ruedas-Torres, I., Rodríguez-Gómez, I.M., Sánchez-Carvajal, J.M., Pallares, F.J., Barranco, I., Carrasco, L., and Gómez-Laguna, J., *Activation of the extrinsic apoptotic pathway in the thymus of piglets infected with PRRSV-1 strains of different virulence*. Veterinary microbiology, 2020. **243**: p. 108639.
667. Pujhari, S. and Zakhartchouk, A.N., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus envelope (E) protein interacts with mitochondrial proteins and induces apoptosis*. Archives of virology, 2016. **161**: p. 1821-1830.
668. Huo, Y., Fan, L., Yin, S., Dong, Y., Guo, X., Yang, H., and Hu, H., *Involvement of unfolded protein response, p53 and Akt in modulation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-mediated JNK activation*. Virology, 2013. **444**(1-2): p. 233-240.
669. Chen, W.-Y., Schnitzlein, W.M., Calzada-Nova, G., and Zuckermann, F.A., *Genotype 2 strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus dysregulate alveolar macrophage cytokine production via the unfolded protein response*. Journal of virology, 2018. **92**(2): p. e01251-17.
670. Schultz-Cherry, S., Dybdahl-Sissoko, N., Neumann, G., Kawaoka, Y., and Hinshaw, V.S., *Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells*. Journal of virology, 2001. **75**(17): p. 7875-7881.
671. Zhirnov, O., Konakova, T., Wolff, T., and Klenk, H.-D., *NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis*. Journal of virology, 2002. **76**(4): p. 1617-1625.
672. Tripathi, S., Batra, J., Cao, W., Sharma, K., Patel, J., Ranjan, P., Kumar, A., Katz, J., Cox, N., and Lal, R., *Influenza A virus nucleoprotein induces apoptosis in human airway epithelial cells: implications of a novel interaction between nucleoprotein and host protein Clusterin*. Cell death and disease, 2013. **4**(3): p. e562-e562.
673. Mazur, I., Anhlan, D., Mitzner, D., Wixler, L., Schubert, U., and Ludwig, S., *The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein*. Cellular microbiology, 2008. **10**(5): p. 1140-1152.
674. Halder, U., Bagchi, P., Chattopadhyay, S., Dutta, D., and Chawla-Sarkar, M., *Cell death regulation during influenza A virus infection by matrix (M1) protein: a model of viral control over the cellular survival pathway*. Cell death and disease, 2011. **2**(9): p. e197-e197.

675. Rossman, J.S. and Lamb, R.A., *Autophagy, apoptosis, and the influenza virus M2 protein*. Cell host and microbe, 2009. **6**(4): p. 299-300.
676. Ampomah, P.B. and Lim, L.H., *Influenza A virus-induced apoptosis and virus propagation*. Apoptosis, 2020. **25**(1-2): p. 1-11.
677. Hayden, M.S. and Ghosh, S., *Shared principles in NF- κ B signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344-362.
678. Hoffmann, A. and Baltimore, D., *Circuitry of nuclear factor κ B signaling*. Immunological reviews, 2006. **210**(1): p. 171-186.
679. Fang, Y., Fang, L., Wang, Y., Lei, Y., Luo, R., Wang, D., Chen, H., and Xiao, S., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 contributes to NF- κ B activation*. Virology journal, 2012. **9**(1): p. 1-10.
680. Luo, R., Fang, L., Jiang, Y., Jin, H., Wang, Y., Wang, D., Chen, H., and Xiao, S., *Activation of NF- κ B by nucleocapsid protein of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Virus Genes, 2011. **42**(1): p. 76-81.
681. Song, C., Krell, P., and Yoo, D., *Nonstructural protein 1 α subunit-based inhibition of NF- κ B activation and suppression of interferon- β production by porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Virology, 2010. **407**(2): p. 268-280.
682. Subramaniam, S., Kwon, B., Beura, L.K., Kuszynski, C.A., Pattnaik, A.K., and Osorio, F.A., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 1 suppresses tumor necrosis factor- α promoter activation by inhibiting NF- κ B and Sp1*. Virology, 2010. **406**(2): p. 270-279.
683. Xiao, S., Jia, J., Mo, D., Wang, Q., Qin, L., He, Z., Zhao, X., Huang, Y., Li, A., and Yu, J., *Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing*. PloS one, 2010. **5**(6): p. e11377.
684. Nimmerjahn, F., Dudziak, D., Dirmeier, U., Hobom, G., Riedel, A., Schlee, M., Staudt, L.M., Rosenwald, A., Behrends, U., and Bornkamm, G.W., *Active NF- κ B signalling is a prerequisite for influenza virus infection*. Journal of General Virology, 2004. **85**(8): p. 2347-2356.
685. Pinto, R., Herold, S., Cakarova, L., Hoegner, K., Lohmeyer, J., Planz, O., and Pleschka, S., *Inhibition of influenza virus-induced NF- κ B and Raf/MEK/ERK activation can reduce both virus titers and cytokine expression simultaneously in vitro and in vivo*. Antiviral research, 2011. **92**(1): p. 45-56.
686. Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A.A., and García-Sastre, A., *Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF- κ B and induction of alpha/beta interferon*. Journal of virology, 2000. **74**(24): p. 11566-11573.
687. Hemmings, B.A. and Restuccia, D.F., *Pi3k-pkb/akt pathway*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. **4**(9): p. a011189.
688. Kennedy, S.G., Kandel, E.S., Cross, T.K., and Hay, N., *Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria*. Molecular and cellular biology, 1999. **19**(8): p. 5800-5810.
689. Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-241.

690. Vara, J.Á.F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and González-Barón, M., *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. *Cancer treatment reviews*, 2004. **30**(2): p. 193-204.
691. Ni, B., Wen, L.-B., Wang, R., Hao, H.-P., Huan, C.-C., Wang, X., Huang, L., Miao, J.-F., Fan, H.-J., and Mao, X., *The involvement of FAK-PI3K-AKT-Rac1 pathway in porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015. **458**(2): p. 392-398.
692. Hale, B.G., Jackson, D., Chen, Y.-H., Lamb, R.A., and Randall, R.E., *Influenza A virus NS1 protein binds p85 β and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(38): p. 14194-14199.
693. Hale, B.G., Batty, I.H., Downes, C.P., and Randall, R.E., *Binding of influenza A virus NS1 protein to the inter-SH2 domain of p85 β suggests a novel mechanism for phosphoinositide 3-kinase activation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(3): p. 1372-1380.
694. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.-e., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **22**(2): p. 153-183.
695. Morrison, D.K., *MAP kinase pathways*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2012. **4**(11): p. a011254.
696. Wei, L. and Liu, J., *Porcine circovirus type 2 replication is impaired by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway*. *Virology*, 2009. **386**(1): p. 203-209.
697. Wei, L. and Liu, J., *Porcine circovirus type 2 replication is impaired by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway*. *Virology*, 2009 (b). **386**(1): p. 203-209.
698. Yin, S., Huo, Y., Dong, Y., Fan, L., Yang, H., Wang, L., Ning, Y., and Hu, H., *Activation of c-Jun NH (2)-terminal kinase is required for porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced apoptosis but not for virus replication*. *Virus research*, 2012. **166**(1-2): p. 103-108.
699. Lee, Y.J. and Lee, C., *Stress-activated protein kinases are involved in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and modulate virus-induced cytokine production*. *Virology*, 2012. **427**(2): p. 80-9.
700. Lee, Y.J. and Lee, C., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication is suppressed by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway*. *Virus research*, 2010. **152**(1-2): p. 50-58.
701. Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F., *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. *The Journal of pathology*, 2010. **221**(1): p. 3-12.
702. Levine, B., *Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense*. *Cell*, 2005. **120**(2): p. 159-162.
703. Chen, T., Tu, S., Ding, L., Jin, M., Chen, H., and Zhou, H., *The role of autophagy in viral infections*. *Journal of Biomedical Science*, 2023. **30**(1): p. 1-25.
704. Han, C., Du, Q., Zhu, L., Chen, N., Luo, L., Chen, Q., Yin, J., Wu, X., Tong, D., and Huang, Y., *Porcine DNAJB6 promotes PCV2 replication via enhancing the formation of autophagy in host cells*. *Vet Res*, 2020. **51**(1): p. 61.

705. Sun, M.-X., Huang, L., Wang, R., Yu, Y.-L., Li, C., Li, P.-P., Hu, X.-C., Hao, H.-P., Ishag, H.A., and Mao, X., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces autophagy to promote virus replication*. *Autophagy*, 2012. **8**(10): p. 1434-1447.
706. Wang, G., Yu, Y., Tu, Y., Tong, J., Liu, Y., Zhang, C., Chang, Y., Wang, S., Jiang, C., Zhou, E.M., and Cai, X., *Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection Induced Apoptosis and Autophagy in Thymi of Infected Piglets*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0128292.
707. Wang, R., Zhu, Y., Zhao, J., Ren, C., Li, P., Chen, H., Jin, M., and Zhou, H., *Autophagy promotes replication of influenza A virus in vitro*. *Journal of Virology*, 2019. **93**(4): p. e01984-18.
708. Zhirnov, O. and Klenk, H., *Influenza A virus proteins NS1 and hemagglutinin along with M2 are involved in stimulation of autophagy in infected cells*. *Journal of virology*, 2013. **87**(24): p. 13107-13114.
709. Lőrincz, P. and Juhász, G., *Autophagosome-lysosome fusion*. *Journal of molecular biology*, 2020. **432**(8): p. 2462-2482.
710. Rossman, J.S. and Lamb, R.A., *Autophagy, apoptosis, and the influenza virus M2 protein*. *Cell host microbe*, 2009. **6**(4): p. 299-300.
711. Zhang, R.-h., Zhang, H.-l., Li, P.-y., Gao, J.-p., Luo, Q., Liang, T., Wang, X.-j., Hao, Y.-q., Xu, T., and Li, C.-H., *Autophagy is involved in the acute lung injury induced by H9N2 influenza virus*. *International immunopharmacology*, 2019. **74**: p. 105737.
712. Pan, H., Zhang, Y., Luo, Z., Li, P., Liu, L., Wang, C., Wang, H., Li, H., Ma, Y., and Physiology, M., *Autophagy mediates avian influenza H5N1 pseudotyped particle-induced lung inflammation through NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular*, 2014.
713. Chae, C., *Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet J*, 2016. **212**: p. 1-6.
714. Opriessnig, T., Gimenez-Lirola, L.G., and Halbur, P.G., *Polymicrobial respiratory disease in pigs*. *Anim Health Res Rev*, 2011. **12**(2): p. 133-48.
715. Jiménez, L.F.M., Nieto, G.R., Alfonso, V.V., and Correa, J.J., *Association of swine influenza H1N1 pandemic virus (SIV-H1N1p) with porcine respiratory disease complex in sows from commercial pig farms in Colombia*. *Virologica Sinica*, 2014. **29**: p. 242-249.
716. Sun, N., Sun, P., Lv, H., Sun, Y., Guo, J., Wang, Z., Luo, T., Wang, S., and Li, H., *Matrine displayed antiviral activity in porcine alveolar macrophages co-infected by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 24401.
717. Sinha, A., Lin, K., Hemann, M., Shen, H., Beach, N.M., Ledesma, C., Meng, X.J., Wang, C., Halbur, P.G., and Opriessnig, T., *ORF1 but not ORF2 dependent differences are important for in vitro replication of PCV2 in porcine alveolar macrophages singularly or coinfecting with PRRSV*. *Vet Microbiol*, 2012. **158**(1-2): p. 95-103.
718. Chang, H.W., Jeng, C.R., Liu, J.J., Lin, T.L., Chang, C.C., Chia, M.Y., Tsai, Y.C., and Pang, V.F., *Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha*. *Vet Microbiol*, 2005. **108**(3-4): p. 167-77.

719. Sirinarumitr, T., Sorden, S.D., Morozov, I., and Paul, P.S., *Double in situ hybridization for simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus (PCV)*. J Vet Diagn Invest, 2001. **13**(1): p. 68-71.
720. Frensing, T., Kupke, S.Y., Bachmann, M., Fritzsche, S., Gallo-Ramirez, L.E., and Reichl, U., *Influenza virus intracellular replication dynamics, release kinetics, and particle morphology during propagation in MDCK cells*. Applied microbiology biotechnology 2016. **100**: p. 7181-7192.
721. Smith, A.M. and Perelson, A.S., *Influenza A virus infection kinetics: quantitative data and models*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology Medicine 2011. **3**(4): p. 429-445.
722. Rovira, A., Balasch, M., Segales, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., and Domingo, M., *Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2*. Journal of virology, 2002. **76**(7): p. 3232-3239.
723. Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., and Kennedy, S., *Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication*. Arch Virol, 2000. **145**(11): p. 2421-9.
724. Meischel, T., Villalon-Letelier, F., Saunders, P.M., Reading, P.C., and Londrigan, S.L., *Influenza A virus interactions with macrophages: lessons from epithelial cells*. Cellular microbiology, 2020. **22**(5): p. e13170.
725. Ghoneim, H.E., Thomas, P.G., and McCullers, J.A., *Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections*. The Journal of Immunology, 2013. **191**(3): p. 1250-1259.
726. Cline, T.D., Beck, D., and Bianchini, E., *Influenza virus replication in macrophages: balancing protection and pathogenesis*. The Journal of general virology, 2017. **98**(10): p. 2401.
727. Hernandez Reyes, Y., Provost, C., Traesel, C.K., Jacques, M., and Gagnon, C.A., *Actinobacillus pleuropneumoniae culture supernatant antiviral effect against porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs prior to the viral genome replication and transcription through actin depolymerization*. J Med Microbiol, 2018. **67**(2): p. 249-264.
728. Levesque, C., Provost, C., Labrie, J., Hernandez Reyes, Y., Burciaga Nava, J.A., Gagnon, C.A., and Jacques, M., *Actinobacillus pleuropneumoniae possesses an antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e98434.
729. Köszegi, M., *La pathogénèse du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRPP) dans un nouveau modèle de cellules épithéliales des voies respiratoires du porc génétiquement modifiées (NPTr-CD163)*. 2019.
730. Günther, J. and Seyfert, H.-M., *The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells*. Seminars in immunopathology, 2018. **40**(6): p. 555-565.

731. Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M.R., and Regamey, N., *The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses*. Clinical microbiology reviews, 2011. **24**(1): p. 210-229.
732. La Gruta, N.L., Kedzierska, K., Stambas, J., and Doherty, P.C., *A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection*. Immunology and cell biology, 2007. **85**(2): p. 85-92.
733. Sang, Y., Rowland, R.R., and Blecha, F., *Interaction between innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Anim Health Res Rev, 2011. **12**(2): p. 149-67.
734. Li, W., Liu, S., Wang, Y., Deng, F., Yan, W., Yang, K., Chen, H., He, Q., Charreyre, C., and Audoneet, J.C., *Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to porcine circovirus type 2*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 353.
735. Vincent, I.E., Balmelli, C., Meehan, B., Allan, G., Summerfield, A., and McCullough, K.C., *Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA*. Immunology, 2007. **120**(1): p. 47-56.
736. Song, S., Bi, J., Wang, D., Fang, L., Zhang, L., Li, F., Chen, H., and Xiao, S., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection activates IL-10 production through NF-kappaB and p38 MAPK pathways in porcine alveolar macrophages*. Dev Comp Immunol, 2013. **39**(3): p. 265-72.
737. Wesley, R.D., Lager, K.M., and Kehrli, M.E., Jr., *Infection with Porcine reproductive and respiratory syndrome virus stimulates an early gamma interferon response in the serum of pigs*. Can J Vet Res, 2006. **70**(3): p. 176-82.
738. Bakre, A.A., Jones, L.P., Murray, J., Reneer, Z.B., Meliopoulos, V.A., Cherry, S., Schultz-Cherry, S., and Tripp, R.A., *Innate Antiviral Cytokine Response to Swine Influenza Virus by Swine Respiratory Epithelial Cells*. Journal of virology, 2021. **95**(15): p. e00692-21.
739. Crosse, K.M., Monson, E.A., Beard, M.R., and Helbig, K.J., *Interferon-stimulated genes as enhancers of antiviral innate immune signaling*. Journal of innate immunity, 2018. **10**(2): p. 85-93.
740. De Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., and Williams, B.R., *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. Journal of leukocyte biology, 2001. **69**(6): p. 912-920.
741. Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M., *A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 481-485.
742. Schoggins, J.W. and Rice, C.M., *Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions*. Current opinion in virology, 2011. **1**(6): p. 519-525.
743. Wu, W., Wang, C., Xia, C., Liu, S., and Mei, Q., *MicroRNA let-7 Suppresses Influenza A Virus Infection by Targeting RPS16 and Enhancing Type I Interferon Response*. Frontiers in Cellular Infection Microbiology, 2022: p. 937.
744. Fong, C.H.-Y., Lu, L., Chen, L.-L., Yeung, M.-L., Zhang, A.J., Zhao, H., Yuen, K.-Y., and To, K.K.-W., *Interferon-gamma inhibits influenza A virus cellular attachment by reducing sialic acid cluster size*. Iscience, 2022. **25**(4): p. 104037.

745. Czerkies, M., Kochańczyk, M., Korwek, Z., Prus, W., and Lipniacki, T., *RSV protects bystander cells against IAV infection by triggering secretion of type I and type III interferons*. bioRxiv, 2022: p. 2021.10. 11.463877.
746. Costa, E.A., Subramanian, K., Nunnari, J., and Weissman, J.S., *Defining the physiological role of SRP in protein-targeting efficiency and specificity*. Science, 2018. **359**(6376): p. 689-692.
747. Leon, K. and Ott, M. *An 'Arms race' between the nonsense-mediated mRNA decay pathway and viral infections*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2021. Elsevier.
748. Lupfer, C., Thomas, P.G., and Kanneganti, T.-D., *Nucleotide oligomerization and binding domain 2-dependent dendritic cell activation is necessary for innate immunity and optimal CD8+ T Cell responses to influenza A virus infection*. Journal of virology, 2014. **88**(16): p. 8946-8955.
749. Coutermarsh-Ott, S., Eden, K., and Allen, I.C., *Beyond the inflammasome: regulatory NOD-like receptor modulation of the host immune response following virus exposure*. The Journal of general virology, 2016. **97**(Pt 4): p. 825.
750. Pandey, K.P. and Zhou, Y., *Influenza A Virus Infection Activates NLRP3 Inflammasome through Trans-Golgi Network Dispersion*. Viruses, 2022. **14**(1): p. 88.
751. Tate, M.D. and Mansell, A., *An update on the NLRP3 inflammasome and influenza: the road to redemption or perdition?* Current opinion in immunology, 2018. **54**: p. 80-85.
752. Malik, G. and Zhou, Y., *Innate immune sensing of influenza A virus*. Viruses, 2020. **12**(7): p. 755.
753. Tate, M.D., Ong, J.D., Dowling, J.K., McAuley, J.L., Robertson, A.B., Latz, E., Drummond, G.R., Cooper, M.A., Hertzog, P.J., and Mansell, A., *Reassessing the role of the NLRP3 inflammasome during pathogenic influenza A virus infection via temporal inhibition*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-8.
754. Thomson, B., *Viruses and apoptosis*. International journal of experimental pathology, 2001. **82**(2): p. 65-76.
755. Zhang, C., Yang, Y., Zhou, X., Yang, Z., Liu, X., Cao, Z., Song, H., He, Y., and Huang, P., *The NS1 protein of influenza A virus interacts with heat shock protein Hsp90 in human alveolar basal epithelial cells: implication for virus-induced apoptosis*. Virology journal, 2011. **8**(1): p. 1-9.
756. Wurzer, W.J., Planz, O., Ehrhardt, C., Giner, M., Silberzahn, T., Pleschka, S., and Ludwig, S., *Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation*. The EMBO journal, 2003. **22**(11): p. 2717-2728.
757. Ren, L., Zhang, W., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, H., Zhu, Y., Meng, X., Yi, Z., and Wang, R., *Influenza A virus (H1N1) infection induces glycolysis to facilitate viral replication*. Virologica Sinica, 2021. **36**(6): p. 1532-1542.
758. Zhao, C., Chen, J., Cheng, L., Xu, K., Yang, Y., and Su, X., *Deficiency of HIF-1 α enhances influenza A virus replication by promoting autophagy in alveolar type II epithelial cells*. Emerging Microbes Infections, 2020. **9**(1): p. 691-706.
759. Patterson, K.I., Brummer, T., O'brien, P.M., and Daly, R., *Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets*. Biochemical Journal, 2009. **418**(3): p. 475-489.

760. Pulido, R. and Lang, R., *Dual specificity phosphatases: from molecular mechanisms to biological function*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(18): p. 4372.
761. Cáceres, A., Perdiguero, B., Gómez, C.E., Cepeda, M.V., Caelles, C., Sorzano, C.O., and Esteban, M., *Involvement of the cellular phosphatase DUSP1 in vaccinia virus infection*. PLoS pathogens, 2013. **9**(11): p. e1003719.
762. Wilczek, M.P., Armstrong, F.J., Geohegan, R.P., Mayberry, C.L., DuShane, J.K., King, B.L., and Maginnis, M.S., *The MAPK/ERK Pathway and the Role of DUSP1 in JCPyV Infection of Primary Astrocytes*. Viruses, 2021. **13**(9): p. 1834.
763. Choi, J.E., Kwon, J.H., Kim, J.-H., Hur, W., Sung, P.S., Choi, S.W., and Yoon, S.K., *Suppression of dual specificity phosphatase 1 expression inhibits hepatitis C virus replication*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119172.
764. Robitaille, A.C., Caron, E., Zucchini, N., Mukawera, E., Adam, D., Mariani, M.K., Gélinas, A., Fortin, A., Brochiero, E., and Grandvaux, N., *DUSP1 regulates apoptosis and cell migration, but not the JIP1-protected cytokine response, during Respiratory Syncytial Virus and Sendai Virus infection*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-15.
765. Goel, S., Saheb Sharif-Askari, F., Saheb Sharif Askari, N., Madkhana, B., Alwaa, A.M., Mahboub, B., Zakeri, A.M., Ratemi, E., Hamoudi, R., and Hamid, Q., *SARS-CoV-2 Switches 'on' MAPK and NFκB Signaling via the Reduction of Nuclear DUSP1 and DUSP5 Expression*. Frontiers in Pharmacology, 2021. **12**: p. 631879.
766. Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S.K., *Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets*. Nature communications, 2019. **10**(1): p. 1-10.
767. Russo, A., *Understanding the mammalian TRAP complex function (s)*. Open biology, 2020. **10**(5): p. 190244.
768. Pauwels, E., Shewakramani, N.R., De Wijngaert, B., Camps, A., Provinciael, B., Stroobants, J., Kalies, K.-U., Hartmann, E., Maes, P., and Vermeire, K., *Structural insights into TRAP association with ribosome-Sec61 complex, and translocon inhibition by a CADA derivative*. bioRxiv, 2022.
769. Jaskolowski, M., Jomaa, A., Gamerdinger, M., Shrestha, S., Leibundgut, M., Deuerling, E., and Ban, N., *Molecular basis of the TRAP complex function in ER protein biogenesis*. bioRxiv, 2022.
770. Pfeffer, S., Dudek, J., Schaffer, M., Ng, B.G., Albert, S., Plitzko, J.M., Baumeister, W., Zimmermann, R., Freeze, H.H., and Engel, B.D., *Dissecting the molecular organization of the translocon-associated protein complex*. Nature communications, 2017. **8**(1): p. 14516.
771. Karki, S., Javanainen, M., Tranter, D., Rehan, S., Huiskonen, J.T., Happonen, L., and Paavilainen, V., *Molecular view of ER membrane remodeling by the Sec61/TRAP translocon*. bioRxiv, 2022.
772. Hamman, B.D., Chen, J.-C., Johnson, E.E., and Johnson, A.E., *The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40–60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane*. Cell, 1997. **89**(4): p. 535-544.
773. Van Coppenolle, F., Vanden Abeele, F., Slomianny, C., Flourakis, M., Hesketh, J., Dewailly, E., and Prevarskaya, N., *Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores*. Journal of cell science, 2004. **117**(18): p. 4135-4142.

774. Sicari, D., Delaunay-Moisan, A., Combettes, L., Chevet, E., and Igarria, A., *A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems*. The FEBS Journal, 2020. **287**(1): p. 27-42.
775. Adams, C.J., Kopp, M.C., Larburu, N., Nowak, P.R., and Ali, M.M., *Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1*. Frontiers in Molecular Biosciences, 2019. **6**: p. 11.
776. Read, A. and Schröder, M., *The unfolded protein response: An overview*. Biology, 2021. **10**(5): p. 384.
777. Wang, S., Li, C., Sun, P., Shi, J., Wu, X., Liu, C., Peng, Z., Han, H., Xu, S., Yang, Y., Tian, Y., Li, J., He, H., Li, J., and Wang, Z., *PCV2 Triggers PK-15 Cell Apoptosis Through the PLC-IP3R-Ca(2+) Signaling Pathway*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 674907.
778. Pan, Y., Li, P., Jia, R., Wang, M., Yin, Z., and Cheng, A., *Regulation of Apoptosis During Porcine Circovirus Type 2 Infection*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2086.
779. Yang, J., Sun, L., Han, J., Zheng, W., and Peng, W., *DUSP1/MKP-1 regulates proliferation and apoptosis in keratinocytes through the ERK/Elk-1/Egr-1 signaling pathway*. Life sciences, 2019. **223**: p. 47-53.
780. Fu, X.-h., Chen, C.-z., Li, S., Han, D.-x., Wang, Y.-j., Yuan, B., Gao, Y., Zhang, J.-b., and Jiang, H., *Dual-specificity phosphatase 1 regulates cell cycle progression and apoptosis in cumulus cells by affecting mitochondrial function, oxidative stress, and autophagy*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2019. **317**(6): p. C1183-C1193.
781. Beckmann, A., Grissmer, A., Meier, C., and Tschernig, T., *Intercellular communication between alveolar epithelial cells and macrophages*. Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger, 2020. **227**: p. 151417.
782. Bissonnette, E.Y., Lauzon-Joset, J.-F., Debley, J.S., and Ziegler, S.F., *Cross-talk between alveolar macrophages and lung epithelial cells is essential to maintain lung homeostasis*. Frontiers in immunology, 2020. **11**: p. 583042.
783. Bougon, J., *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*. 2021, Université Rennes 1.
784. Punyadarsaniya, D., Liang, C.-H., Winter, C., Petersen, H., Rautenschlein, S., Hennig-Pauka, I., Schwegmann-Wessels, C., Wu, C.-Y., Wong, C.-H., and Herrler, G., *Infection of differentiated porcine airway epithelial cells by influenza virus: differential susceptibility to infection by porcine and avian viruses*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28429.
785. Fu, Y., Tong, J., Meng, F., Hoeltig, D., Liu, G., Yin, X., and Herrler, G., *Ciliostasis of airway epithelial cells facilitates influenza A virus infection*. Veterinary research, 2018. **49**(1): p. 1-4.
786. Majorova, D., Atkins, E., Martineau, H., Vokral, I., Oosterhuis, D., Olinga, P., Wren, B., Cuccui, J., and Werling, D., *Use of precision-cut tissue slices as a translational model to study host-pathogen interaction*. Frontiers in veterinary science, 2021. **8**: p. 686088.
787. Ratnasiri, K., Wilk, A.J., Lee, M.J., Khatri, P., and Blish, C.A. *Single-cell RNA-seq methods to interrogate virus-host interactions*. in *Seminars in Immunopathology*. 2023. Springer.
788. Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., and Shafee, T., *Transcriptomics technologies*. PLoS computational biology, 2017. **13**(5): p. e1005457.

789. Sledz, C.A. and Williams, B.R.G., *RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways*. Biochemical Society Transactions, 2004. **32**(6): p. 952-956.
790. Myers, J.W., Chi, J.-T., Gong, D., Schaner, M.E., Brown, P.O., and Ferrell Jr, J.E., *Minimizing off-target effects by using diced siRNAs for RNA interference*. Journal of RNAi Gene Silencing: An International Journal of RNA Gene Targeting Research, 2006. **2**(2): p. 181.
791. Park, C., Oh, Y., Seo, H.W., Han, K., and Chae, C., *Comparative effects of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a PCV2-PRRSV challenge model*. Clinical Vaccine Immunology, 2013. **20**(3): p. 369-376.

Annexes

1. Figures

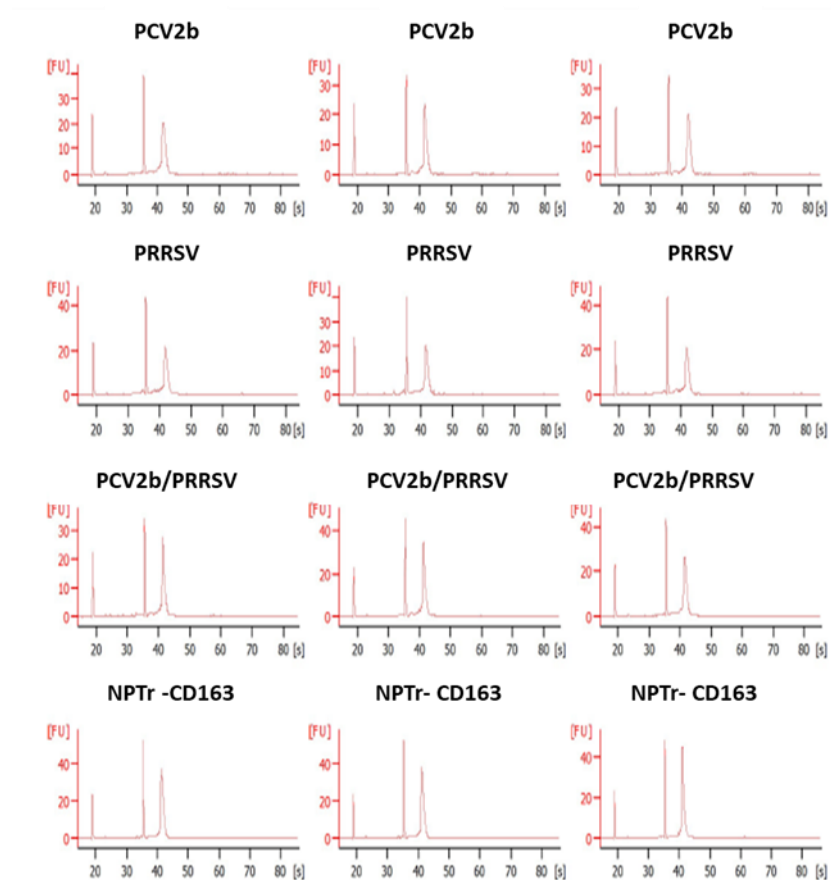


Figure 1. – Les profils du Bioanalyzer pour chacun des échantillons d'ARN purifiés à partir de cellules NPTr-CD163 infectées par PCV2b, VSRRP et PCV2b/VSRRP. Les électrophérogrammes montrent les deux pics ribosomiques typiques correspondant à 18S et 28S de l'ARN eucaryote.

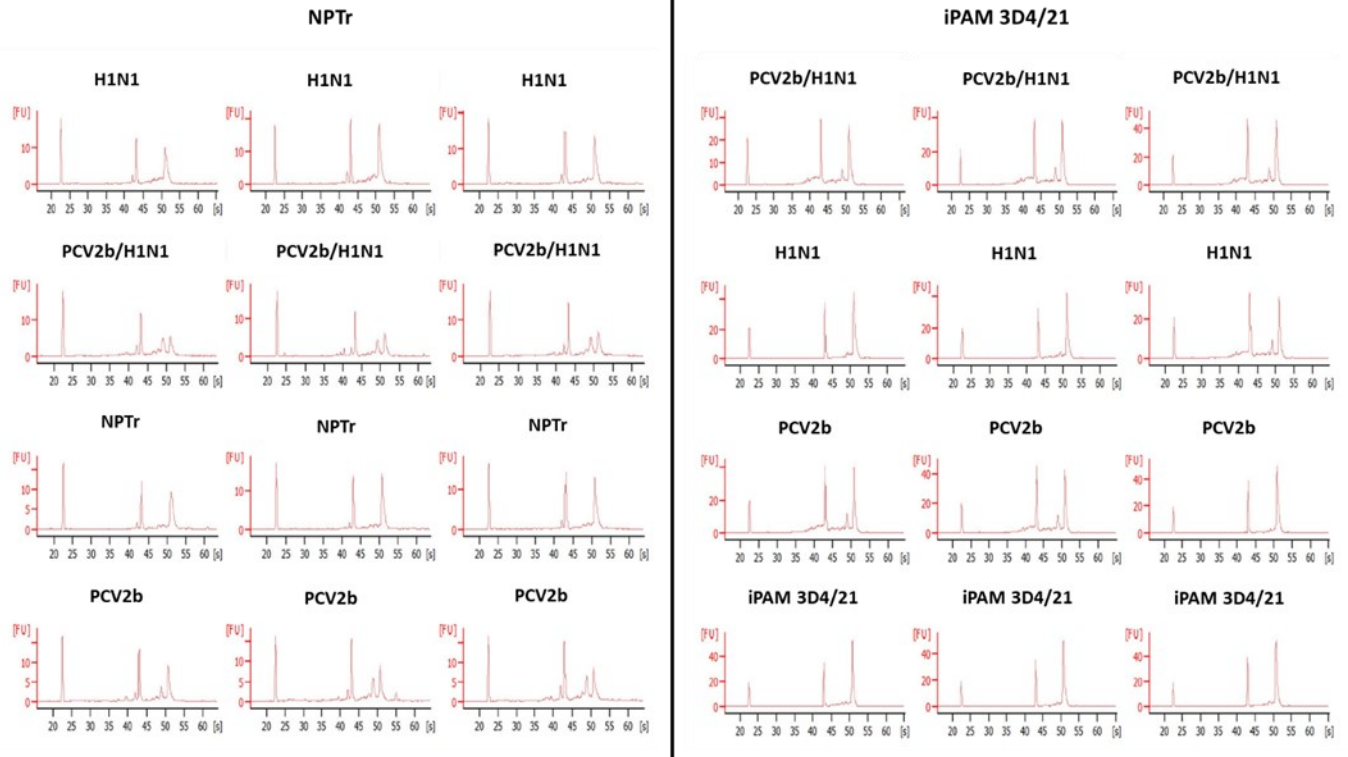


Figure 2. – Les profils du Bioanalyzer pour chacun des échantillons d'ARN purifiés à partir de cellules NPTTr et iPAM 3D4/21 infectées par PCV2b, VIP et PCV2b/VIP H1N1. Les électrophérogrammes montrent les deux pics ribosomiques typiques correspondant à 18S et 28S de l'ARN eucaryote.

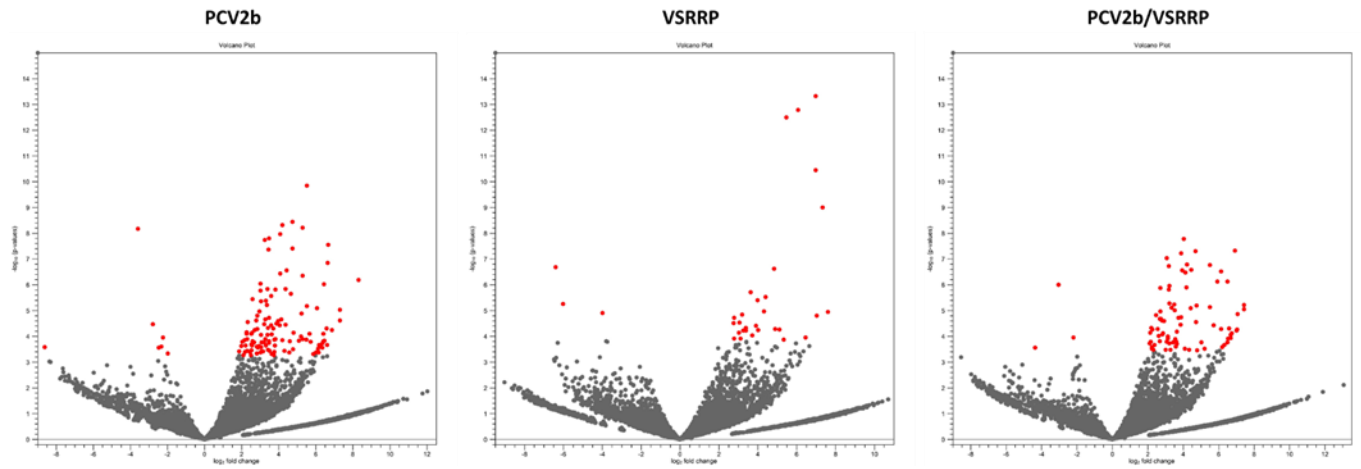


Figure 3. – Volcano plots montrant la distribution des gènes différentiellement exprimés (DEGs) identifiés dans les cellules NPT_r-CD163 infectées par PCV2b, VSRRP et PCV2b/VSRRP. Les DEGs ayant un FDR < 0,05 sont surlignés en rouge).

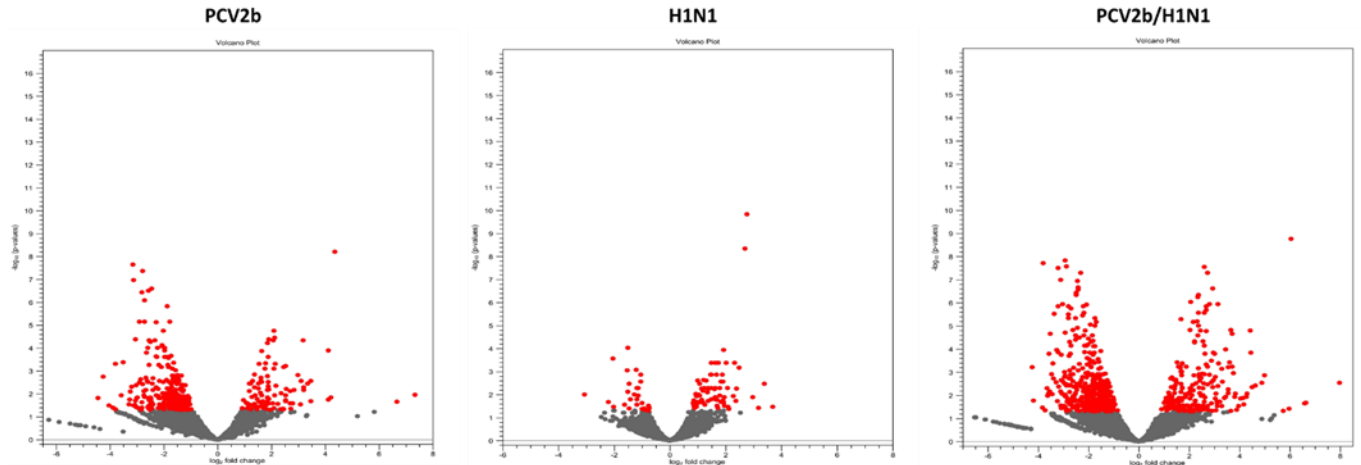


Figure 4. – Volcano plots montrant la distribution des gènes différentiellement exprimés (DEGs) identifiés dans les cellules NPT*r* infectées par PCV2b, VIP H1N1 et PCV2b/VIP H1N1. Les DEGs ayant un FDR < 0,05 sont surlignés en rouge).

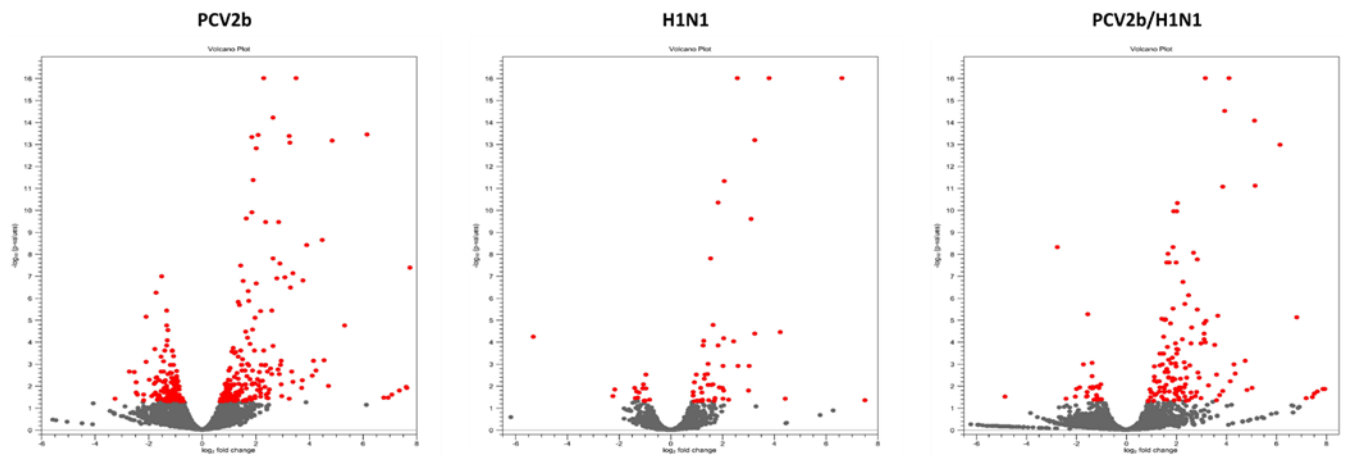


Figure 5. – Volcano plots montrant la distribution des gènes différentiellement exprimés (DEGs) identifiés dans les cellules iPAM 3D4/21 infectées par PCV2b, VIP H1N1 et PCV2b/VIP H1N1. Les DEGs ayant un FDR < 0,05 sont surlignés en rouge).

2. Liste des réalisations durant les études de doctorat.

2.1- Bourses et prix obtenus

Période de financement	Bourses et prix
2017-2019	Bourse C d'exemption des droits de scolarités supplémentaires pour étudiants étrangers de l'UdeM
2017	Bourse d'excellence d'admission au doctorat de l'UdeM
2017	Bourse de dépannage « juin 2017 » du Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA), FMV, UdeM
2019	Bourse d'excellence de 2e année de doctorat de l'UdeM
2019	Bourse de doctorat en recherche du Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT)
2022	Travel Award pour le 4eme Symposium de la société canadienne de virologie
2022	Prix de la meilleure présentation orale lors de l'assemblée générale annuelle du Centre de développement du porc du Québec (CDPQ)

2.2- Implications sociales et académiques

2.2.1- Activités de rayonnement effectuées durant les études

-Participation à l'activité de vulgarisation scientifique du Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole, CRIPA, auprès de 89 élèves de l'école primaire Assomption (Saint-Hyacinthe, 2018).

-Participation à l'organisation et déroulement de deux rencontres de réseautage « Vin et Fromage », entre les professeurs et cliniciens enseignants de la Faculté de médecine vétérinaire, UdeM (automne 2022).

2.2.2- Assistanats d'enseignement et de recherche

-Auxiliaire d'enseignement pour les Travaux Pratiques des cours DMV 2120 (trimestre d'Automne 2019), DMV1220 (trimestre d'Hiver 2020 et d'Hiver 2022) à la Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

-Correction des examens des cours DMV2120 et cours DMV3221 (trimestre d'Hiver2019).

- Supervision des microstages en recherche des étudiants du Cégep de Saint-Hyacinthe (trimestre d'Hiver 2019).

2.3- Conférences et présentations

- | | |
|-------------------|---|
| 15 Mai 2018 | Ureaplasma diversum, a bovine pathogen found for the first time in the respiratory tract of swine in Canada, présentation orale, 11e Symposium du CRIPA. |
| 8 Novembre 2018 | Effet d'une infection mixte au circovirus porcin et au virus influenza porcin sur la pathogenèse virale, présentation par affiche, Journée de la recherche de la FMV. |
| 26-29 Mai 2019 | Ureaplasma diversum, a bovine pathogen identified for the first time in the respiratory tract of swine in Canada, présentation par affiche, 18th annual meeting of the Canadian Animal Health Laboratorians Network. |
| 3-5 Juin 2019 | Effect of co- infections of Porcine circovirus 2b and Swine Influenza virus H1N1 in epithelial cells and swine alveolar macrophages, présentation par affiche, 12e Symposium du CRIPA. |
| 7-8 Juin 2021 | Comparison of gene expression profiles of NPTr-CD163 cells single-infected and co-infected with PCV2b and PRRSV, présentation par affiche, Nido2021 – XVth International Nidovirus Symposium. |
| 5-7 Juin 2022 | Comparison of gene expression profiles of NPTr-CD163 cells single-infected and co-infected with PCV2b and PRRSV, présentation par affiche, 4th Symposium of the Canadian Society for Virology. |
| 20 Septembre 2022 | Les infections virales en présence de circovirus porcin de type 2: mieux comprendre ses bases et ses effets dans les cellules de porc, présentation orale, Assemblée générale annuelle du Centre de développement du porc du Québec (CDPQ). |

2.4- Publications

Auteur

1. Burgher, Y., Koszegi, M., St-Sauveur, V. G., Fournier, D., Lafond-Lambert, C., Provost, C., & Gagnon, C. A. (2018). Canada: First report of *Ureaplasma diversum*, a bovine pathogen, in the respiratory tract of swine in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 59(12), 1333.
2. Burgher Pulgaron Y, Provost C, Pesant MJ, Gagnon CA. Porcine Circovirus Modulates Swine Influenza Virus Replication in Pig Tracheal Epithelial Cells and Porcine Alveolar Macrophages. *Viruses*. 2023 May 20;15(5):1207.
3. Burgher Pulgaron, Y., Provost, C., Pesant, MJ., Gagnon, C. A. (2023). DUSP1 mRNA modulation during porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-infection regulates viruses replication. *Virus Research* (soumis).

Co-auteur

Salmin, A. F., Pesant, M. J., Burgher, Y., Provost, C., Labrie, J., Jacques, M., ... & Beaudry, F. (2022). Untargeted and targeted metabolomics reveal that adenosine nucleotides released in *Actinobacillus pleuropneumoniae* supernatant inhibit porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication. *Talanta*, 242, 123315.