

Entrée cellulaire des phlébovirus chez l'hôte mammifère

Zina M. Uckeley^{1,a}Jana Koch^{1,a}Nicole D. Tischler²Pysylia Léger¹Pierre-Yves Lozach^{1,3}

¹ University Hospital Heidelberg, CellNetworks – Cluster of Excellence and Department of Infectious Diseases, Virology, Im Neuenheimer Feld 344, 69120 Heidelberg, Allemagne

² Fundación Ciencia & Vida, Molecular Virology Laboratory, Av. Zañartu 1482, 7780272 Santiago, Chile

³ IVPC UMR754, INRA, Université Claude-Bernard-Lyon 1, EPHE, 50, avenue Tony-Garnier, 69007 Lyon, France

^a Ces auteurs ont contribué à ce travail de façon équivalente.

Résumé. Les phlébovirus sont des virus essentiellement transmis à leurs hôtes mammifères par des vecteurs phlébotomes et tiques, plus rarement, moustiques. Ces virus sont présents sur tous les continents et nombreux sont ceux à l'origine de maladies graves, souvent mortelles, chez les animaux domestiques et l'homme. Le réchauffement climatique, l'expansion géographique des réservoirs d'arthropodes et le nombre croissant d'épidémies alertent sur le fait que les phlébovirus doivent être désormais sérieusement considérés comme agents potentiels de maladies émergentes. Cette revue propose de s'intéresser aux étapes précoces de l'infection par les phlébovirus, au niveau moléculaire et cellulaire. Nous aborderons les connaissances et progrès les plus récents sur l'entrée cellulaire de ces virus chez leur hôte mammifère, depuis leur attachement à la surface de la cellule cible jusqu'à leur pénétration dans le cytosol. Nous détaillerons ainsi les récepteurs, les facteurs cellulaires, les voies endocytaires et les mécanismes de fusion utilisés par les phlébovirus pour pénétrer dans la cellule hôte.

Mots clés : arbovirus, arthropode, banyangvirus, bunyavirus, endocytose, entrée cellulaire, fusion, phlébovirus, récepteur, Rift, Toscana, Uukuniemi, virus à ARN, VFST

Abstract. Phleboviruses constitute a large group of arthropod-borne viruses (arboviruses), mainly transmitted to their hosts by sandflies and ticks, occasionally by mosquitoes. These viruses have a worldwide distribution and many cause serious diseases – often fatal – in both domestic animals and humans. The global warming, the apparent wide distribution of arthropod reservoirs, and the increasing number of outbreaks show that phleboviruses must be taken seriously as emerging disease agents. This review proposes to focus on the early steps of phlebovirus infection, from virus binding to penetration into the cytosol. We address the most recent knowledge and advances in the entry of these viruses into vertebrate host cells, including virus receptors, cellular factors, endocytic pathways, and fusion.

Key words: arbovirus, arthropod, banyangvirus, bunyavirus, cell entry, endocytosis, fusion, phlebovirus, receptor, Rift, RNA virus, SFTSV, Toscana, Uukuniemi

Introduction

Au sein de la famille virale des *Phenuiviridae* dans l'ordre des *Bunyavirales* (tableau 1), le genre *Phlebovirus* comprend plus de 50 isolats [1, 2]. Ces virus,

présents dans le monde entier, infectent un large spectre d'hôtes et sont essentiellement transmis par des phlébotomes et tiques, plus rarement par des moustiques [3]. Plusieurs membres causent chez les animaux et l'homme de graves maladies, souvent mortelles, comme des hépatites, encéphalites et fièvres hémorragiques. Certains sont classés comme armes biologiques par l'armée américaine et requièrent des niveaux élevés de biosécurité pour pouvoir être étudiés. Plusieurs figurent sur la liste des agents

Correspondance : P.-Y. Lozach
<pierre-yves.lozach@med.uni-heidelberg.de>

doi:10.1684/vir.2019.0730

Tableau 1 Classification au sein de la famille des *Phenuiviridae* [1, 2].

Genre	Espèce	Espèce(s) type(s) (abréviation)
<i>Banyangvirus</i>	3	Virus Huaiyangshan (= virus à fièvre sévère avec thrombocytopénie [VFST]) Virus Heartland (VHRT)
<i>Beidivirus</i>	1	Virus du diptère d'Hubei de type 3
<i>Goukovirus</i>	3	Virus de Gouleako
<i>Horwuvirus</i>	1	Virus du taon de Wuhan
<i>Hudivirus</i>	1	Virus du diptère d'Hubei de type 4
<i>Hudovirus</i>	1	Virus de lépidoptère d'Hubei de type 1
<i>Kabutovirus</i>	2	Virus de Huangpi
<i>Laulavirus</i>	1	Virus du lac Laurel
<i>Mobuvirus</i>	1	Virus de Mothra
<i>Phasivirus</i>	3	Virus de Badu
<i>Phlebovirus</i>	10	Virus de la fièvre de la vallée du Rift (VFVR) Virus de Punta Toro (VPT) Virus de Toscana (VTOS) Virus d'Uukuniemi (VUUK)
<i>Pidchovirus</i>	1	Virus Pidgey
<i>Tenuivirus</i>	7	Virus de la rayure du riz
<i>Wenrivirus</i>	1	Virus de la crevette de Wenzhou
<i>Wubeivirus</i>	2	Virus du mille-pattes de Wuhan de type 2

pathogènes hautement prioritaires de l'Organisation mondiale de la santé [4]. Aucun vaccin ou traitement n'est actuellement approuvé pour un usage chez l'homme.

Avec l'activité humaine et le réchauffement climatique qui favorisent la dissémination de leurs vecteurs vers de nouvelles régions, les foyers d'infection à phlébovirus ne se limitent plus aux pays tropicaux. Un exemple récent est le virus de la fièvre de la vallée du Rift (VFVR), un phlébovirus propagé par des moustiques qui est responsable de fièvres hémorragiques et de malformations fœtales chez l'homme et les animaux domestiques [5]. Le virus s'est répandu à travers l'Afrique puis vers l'Arabie saoudite et Madagascar au cours des dernières décennies. Il présente désormais un risque d'introduction dans le sud de l'Europe. Une autre illustration de la propagation de ces pathogènes est le phlébovirus de Toscana (VTOS), un agent pathogène transmis par des phlébotomes causant des méningo-encéphalites chez l'homme [6]. Le VTOS a émergé dans le bassin méditerranéen dans les années 1970 et cause un nombre croissant de foyers d'infection en Espagne, en Italie et dans le sud de la France.

Les phlébovirus représentent une menace mondiale pour le bétail, la productivité agricole et la santé publique. Ils doivent être sérieusement considérés comme des agents potentiels de maladies émergentes et ré-émergentes. La plu-

part des informations disponibles sur ces virus proviennent d'études portant sur un nombre limité d'isolats, principalement le VFVR et le virus d'Uukuniemi (VUUK), un phlébovirus transmis par des tiques. Le VUUK n'est associé à aucune maladie connue chez l'homme et a longtemps servi, et sert encore, de modèle pour étudier les phlébovirus les plus dangereux [7]. De nombreux aspects fondamentaux de la biologie cellulaire des phlébovirus restent à élucider, en particulier, en ce qui concerne les étapes initiales de l'infection. Comprendre les processus d'entrée dans la cellule hôte est un prérequis évident pour pouvoir développer des traitements efficaces contre les infections phlébovirales actuelles et futures.

Dans cette revue, nous traitons les connaissances et les avancées les plus récentes concernant le programme d'entrée cellulaire des phlébovirus chez leur hôte mammifère, depuis leur liaison à la surface de la cellule jusqu'à leur pénétration dans le cytosol. Les mécanismes d'entrée des virus à fièvre sévère avec thrombocytopénie (VFST) et Heartland (VHRT), apparus en Asie et en Amérique du Nord il y a une décennie [8, 9], seront également abordés. Bien que le VFST et le VHRT appartiennent désormais au genre des *Banyangvirus* (tableau 1) [2], ils sont très proches au niveau moléculaire et cellulaire des phlébovirus, et plus particulièrement, du VUUK [7]. Comme ce dernier, ils sont également transmis par des tiques. À leur découverte, le

VFST et le VHRT ont été classés parmi les phlébovirus et ce n'est que très récemment qu'ils se sont vus attribuer leur propre genre [2]. D'ailleurs, certains continuent de les considérer comme des phlébovirus [1].

Organisation génomique et structurale des particules phlébovirales

Les phlébovirus, ainsi que les banyangvirus, sont enveloppés d'une bicouche lipidique avec un génome à ARN simple brin tri-segmenté de polarité négative (*figure 1A*) [10]. L'ARN viral se réplique exclusivement dans le cytosol et code pour au moins quatre protéines structurales [10]. Le plus long segment d'ARN génomique, le segment L, code pour une ARN polymérase ARN-dépendante, nécessaire à l'initiation de la réplication du virus après la libération du génome viral dans le cytosol. Le segment intermédiaire, M, lui code pour un polypeptide précurseur des deux glycoprotéines d'enveloppe, G_N et G_C (*figure 1B*) [11, 12]. Le clivage protéolytique de ce précurseur a lieu dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, où les virions s'assemblent et acquièrent leur enveloppe lipidique. La localisation et les mécanismes exacts de la maturation des glycoprotéines G_N et G_C , ainsi que du bourgeonnement des particules virales, peuvent différer selon les isolats et les types cellulaires. Ils restent très souvent à élucider.

Le plus petit segment, S, code pour la nucléoprotéine N qui constitue, avec la polymérase et l'ARN viral, les ribonucléoprotéines trouvées à l'intérieur des virions (*figure 1A*) [10]. Les phlébovirus ne possèdent pas de matrice classique ou de structure interne rigide. La protéine N joue donc un rôle important dans la protection de l'information génétique de ces virus. Au cours des dernières années, la structure cristalline de la protéine N a été résolue pour plusieurs phlébovirus, fournissant de nouvelles informations sur les mécanismes d'assemblage des ribonucléoprotéines [13]. Les phlébovirus codent également pour une à deux protéines non structurales, NSs et NSm, mais jusqu'à présent, aucune des deux n'a été impliquée dans l'entrée cellulaire des virions et elles ne seront donc pas discutées ici [14].

À la surface des particules virales, les deux glycoprotéines d'enveloppe, G_N et G_C , sont responsables de la liaison des virions aux cellules cibles puis de leur pénétration dans le cytosol [3]. Des micrographies électroniques montrent que les particules phlébovirales sont globalement sphériques et de taille hétérogène, avec un diamètre compris entre 80 et 160 nm [10]. Des études récentes de cryo-tomographie électronique ont confirmé le degré élevé de pléomorphisme précédemment observé pour les phlébovirus [15-17]. Des analyses ultra-structurales du VFVR et du VUUK ont révélé

que les particules les plus régulières présentent à leur surface des protubérances formant un réseau icosaédrique avec une triangulation atypique de type T=12 (*figure 1C*) [15-17].

Récepteurs cellulaires des phlébovirus chez l'hôte mammifère

Pour initier l'infection, les virus doivent d'abord s'attacher à leurs cellules cibles et, ensuite, accéder à l'espace intracellulaire pour se répliquer. La première étape dépend étroitement de la présence de récepteurs de surface, notamment des protéines, des lipides ou des carbohydrates, auxquels les particules virales se lient [18]. Certains de ces récepteurs sont capables, seuls, de déclencher l'entrée des particules virales dans la cellule. D'autres limitent la libre diffusion des virions et/ou favorisent des interactions avec des molécules de surface secondaires qui sont, elles, responsables de la pénétration des virus dans le cytoplasme [18]. Lorsque les virus dépendent de nombreux facteurs cellulaires de surface pour la liaison et l'entrée, le récepteur primaire est souvent appelé facteur d'attachement, et les récepteurs secondaires, corécepteurs. Seuls quelques facteurs d'attachement et récepteurs sont connus pour les phlébovirus et, très souvent, leur rôle dans l'entrée cellulaire reste à découvrir (*tableau 2*).

Les interactions entre virus et récepteurs sont souvent spécifiques et multivalentes. La liaison à plusieurs molécules d'un même récepteur, regroupées au sein de microdomaines, peut accroître l'avidité d'interactions de faible affinité [18]. Par exemple, les glycoprotéines et les glycolipides présents dans la matrice extracellulaire de la plupart des cellules de mammifères constituent des structures hautement polaires. Malgré des interactions de faible affinité, du fait de leur nature électrostatique, ces structures servent de site d'attachement pour de nombreux virus, dont les phlébovirus. Il a été montré que des glycosaminoglycans (GAG), tels que les héparanes sulfates, facilitent les infections par le VFVR et le VTOS [19-21]. L'infection par ces deux virus est ainsi fortement réduite en présence d'héparine, un compétiteur des GAG à la surface des cellules. De plus, la digestion enzymatique des héparanes sulfates à la surface cellulaire, préalablement à l'exposition des cellules aux virus, produit des résultats similaires. Enfin, des cellules déficientes pour la synthèse des héparanes sulfates affichent une moindre sensibilité au VFVR [19, 21]. De façon intéressante, les glycoprotéines de la souche du VFVR amplifiée en culture cellulaire, et utilisée dans l'une de ces études, ne diffèrent pas dans leur composition en acides aminés basiques de celles des virus isolés à partir d'animaux infectés [19]. Ce résultat suggère que la

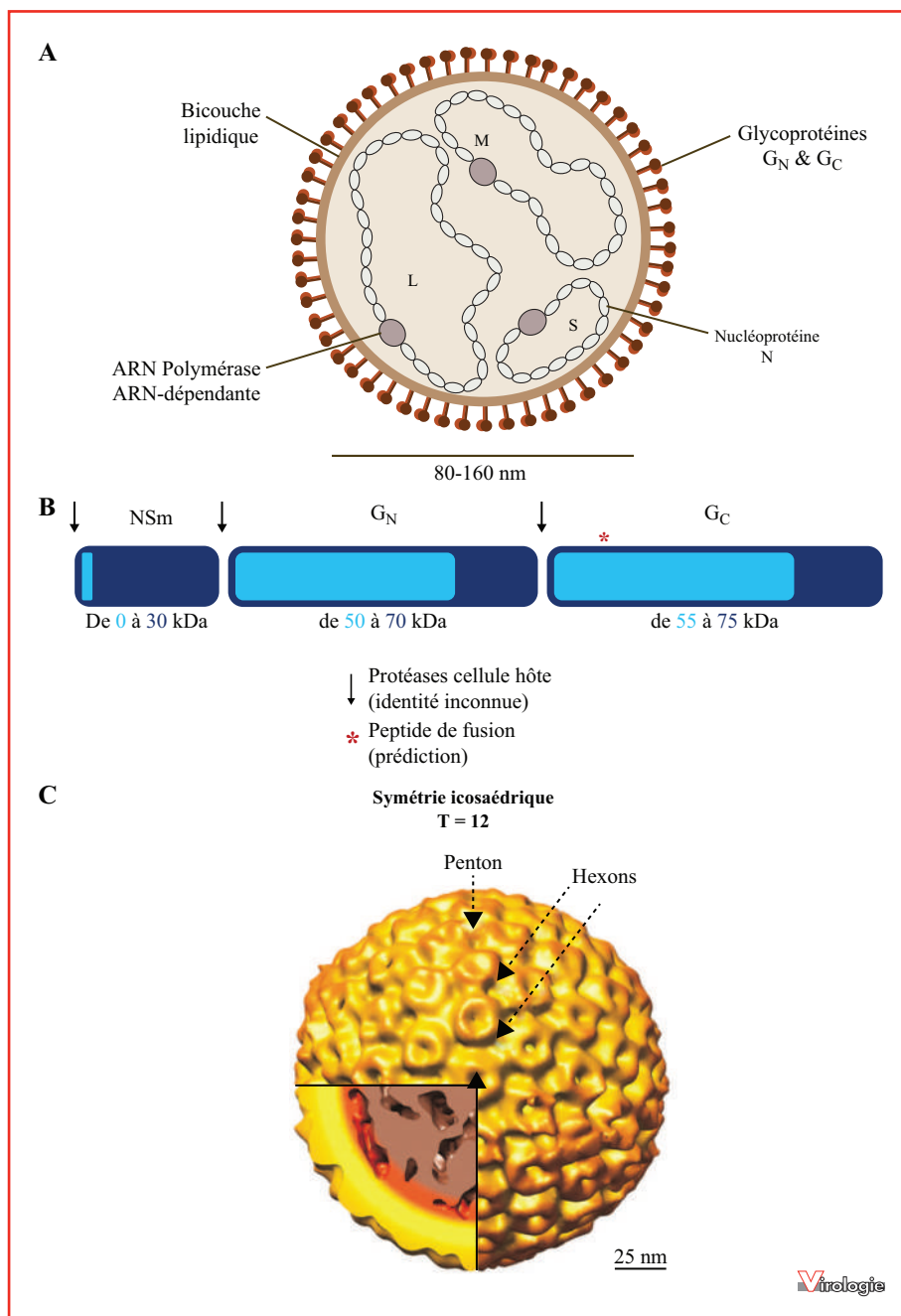


Figure 1. Organisation structurale des particules phlébovirales. **A)** Particule phlébovirale. Les trois segments génomiques viraux sont dénommés en fonction de leur taille : S (petit), M (moyen) et L (grand). **B)** Précurseur polypeptidique M des glycoprotéines G_N et G_C . La taille du précurseur M, ainsi que celle de ses produits de clivage, varient significativement d'un virus à l'autre. Certains phlébovirus possèdent, en plus de G_N et G_C , une protéine non structurale, NSm. Les rectangles de couleur bleu clair et bleu foncé représentent l'amplitude des variations observées parmi les phlébovirus quant au poids moléculaire de leurs protéines NSm, G_N et G_C [12]. L'intervalle des valeurs en kDa est aussi indiqué en dessous de chaque protéine. La position du peptide de fusion est donnée sur la base de la structure cristalline obtenue pour la glycoprotéine G_C du virus de la fièvre de la vallée du Rift (VFVR) [48]. **C)** Représentation schématique de la disposition des glycoprotéines G_N et G_C à la surface des particules virales. La symétrie présentée ici a été obtenue par l'analyse en cryo-tomographie électronique du VFVR [16, 17] et du virus d'Uukuniemi (VUUK) [15]. L'unité asymétrique icosaédrique est indiquée par le triangle noir. La figure est adaptée de la référence [16], avec l'autorisation de l'*American Society for Microbiology*.

Tableau 2 Récepteurs potentiels connus pour les phlébovirus et les banyangvirus chez l'hôte mammifère.

Récepteur/cofacteur	Isolats	Références
DC-SIGN	ppVFST, VFVR, VPT, VTOS, VUUK	[22-24, 27]
L-SIGN	ppVFST, VFVR, VTOS, VUUK	[23, 24, 30]
LSECTin	ppVFST	[24]
Héparanes sulfates	VFVR, VTOS	[19-21]
NMMHC-IIA	VFST	[31]

NMMHC-IIA : chaîne lourde de myosine non musculaire de type IIA ; ppVFST : rhabdovirus pseudotypé avec les glycoprotéines G_N et G_C du virus à fièvre sévère avec thrombocytopénie ; VFST : virus à fièvre sévère avec thrombocytopénie ; VFVR : virus de la fièvre de la vallée du Rift ; VPT : virus Punta Toro ; VTOS : virus de Toscana ; VUUK : virus d'Uukuniemi.

dépendance du VFVR aux héparanes sulfates ne résulte pas de l'adaptation du virus à la culture cellulaire. Cependant, le fait que certains types de cellule demeurent permissifs à l'infection, même dépourvus de GAG, indique que les phlébovirus peuvent utiliser des récepteurs alternatifs.

Un certain nombre d'évidences indique que plusieurs phlébovirus sont capables d'utiliser la lectine humaine de type C, DC-SIGN, pour cibler et infecter les cellules dendritiques (CD) du derme [22]. En présence d'anticorps neutralisants, les CD dermiques deviennent résistantes à l'infection par le VFVR et le VUUK [22]. L'expression de DC-SIGN à la membrane plasmique confère à des cellules originellement peu permissives une très grande sensibilité à de nombreux phlébovirus dont le VFVR, le VUUK, le VTOS et Punta Toro [22]. La liste des phlébovirus décrits pour interagir avec DC-SIGN a depuis été étendue aux banyangvirus. Deux études récentes démontrent, entre autres, que la lectine facilite l'infection par des particules rhabdovirales pseudotypées avec les glycoprotéines du VFST [23, 24]. DC-SIGN représente un candidat moléculaire intéressant pour faire le lien entre les virus provenant d'arthropodes et l'infection initiale dans la peau de l'hôte humain. Ce récepteur immun est :

- principalement exprimé à la surface des CD dermiques immatures, présentes dans le site anatomique de la transmission de ces virus ;
- spécialisé dans la capture d'antigènes étrangers à forte teneur en résidus mannose, tels ceux trouvés dans les glycoprotéines de virus produits en insectes [3, 25].

Pour ces raisons, les interactions entre DC-SIGN et les agents pathogènes transmis par des insectes et tiques sont considérées comme les plus pertinentes ; bien que plusieurs études aient suggéré un rôle de la lectine dans l'infection par divers microbes ne se propageant pas *via* des arthropodes [25].

Les phlébovirus possèdent en général de nombreuses *N*-glycosylations à la surface des particules, réparties entre les glycoprotéines d'enveloppe G_N et G_C [11, 26]. Le VFVR possède, par exemple, un site de glycosylation dans G_N et quatre dans G_C . Il apparaît que le site N438 dans

G_N et un seul dans G_C , N1077, soient importants pour l'infection médiée par DC-SIGN [27]. Il est tentant de faire le parallèle avec le virus de la dengue (famille des *Flaviviridae*). L'engagement de multiples molécules de glycoprotéine d'enveloppe E par des homo-tétramères de DC-SIGN explique les interactions de forte avidité entre la lectine et le virus [28]. Il en est probablement de même pour les interactions entre DC-SIGN et les phlébovirus.

Les lectines humaines de type C L-SIGN et LSECTin, toutes deux étroitement apparentées à DC-SIGN mais exprimées à la surface de l'endothélium du foie [29], sont également utilisées comme récepteur par plusieurs phlébovirus, incluant le VFVR, le VTOS, et le VUUK ainsi que le banyangvirus VFST [23, 24, 30]. Il est à noter que les interactions entre ces deux lectines et le VFST n'ont pas été établies avec le virus lui-même mais avec des particules rhabdovirales pseudotypées avec les glycoprotéines G_N et G_C [23, 24]. Il est possible, qu'en agissant comme récepteur à la surface de l'endothélium du foie, L-SIGN et LSECTin participent au tropisme hépatique de certains phlébovirus et banyangvirus.

La chaîne lourde de myosine non musculaire de type IIA (NMMHC-IIA) a été proposée pour agir comme un facteur d'attachement pour le VFST [31]. Ce facteur a été identifié par l'emploi d'une stratégie combinant co-immunoprécipitation et analyse de spectrométrie de masse, utilisant un fragment de l'ectodomaine de G_N comme appât. NMMHC-IIA a une localisation essentiellement intracellulaire mais, dans certains cas, semble pouvoir atteindre la face externe de la membrane plasmique, notamment dans les cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale et les cellules Vero [31]. L'inactivation du gène codant pour NMMHC-IIA par de petits ARN interférents (pARNi) conduit à une diminution significative de l'infection par le VFST. Dans les cellules HeLa, qui n'expriment pas ce gène mais qui sont tout de même sensibles à l'infection, l'expression ectopique de NMMHC-IIA résulte dans une permissivité accrue au VFST [31]. Nous ignorons, cependant, si cette protéine sert de récepteur d'entrée ou simplement de facteur d'attachement.

Plus récemment, le VFST a été observé dans des vésicules de sécrétion arborant CD63, un marqueur des vésicules extracellulaires [32]. Il apparaît que les virions à l'intérieur de ces vésicules sont efficacement délivrés dans les cellules voisines non infectées. Ce travail est la première démonstration du détournement de la machinerie d'exocytose par un phénuivirus pour assurer sa transmission aux cellules environnantes, sans recours direct à l'un de ses récepteurs d'entrée.

Internalisation des phlébovirus dans la cellule

Pour être internalisés et pénétrer dans la cellule hôte, les phlébovirus dépendent de la machinerie d'endocytose (*figure 2*). Le nombre d'études sur les récepteurs et voies endocytaires utilisés par les phlébovirus a significativement augmenté au cours des dernières années (*tableau 3*). Toutefois, après l'attachement des virions à leur(s) récepteur(s), le processus de passage de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule reste à découvrir pour la plupart des phlébovirus, et d'ailleurs, pour la plupart des virus. En combinant l'utilisation de particules du VUUK marquées avec des fluorophores [33] et l'expression de molécules de DC-SIGN fusionnées à une protéine fluorescente, il a été possible de visualiser des interactions virus-récepteur en cellules vivantes pour la première fois [22]. Ce modèle a ainsi rendu possible l'analyse de la dynamique de ces interactions, et notamment, d'observer le recrutement de molécules de récepteur vers le site de liaison du VUUK à la surface cellulaire [22]. Cela conforte l'hypothèse selon laquelle certains virus rassemblent leurs récepteurs au site de contact avec la cellule, générant ainsi un microdomaine riche en récepteurs dans la membrane plasmique. Une telle série d'événements est sans doute une condition préalable à la courbure locale de la membrane plasmique, et à la transduction de signaux médiés par les récepteurs, afin d'entraîner l'internalisation des virions dans la machinerie d'endocytose [18].

Le cholestérol et d'autres lipides jouent aussi, très certainement, un rôle dans les mécanismes précoces d'interactions virus-récepteur, en favorisant la formation de sites d'ancrage pour des cofacteurs cellulaires. Une étude sur l'entrée du VFST et du VHRT dans des cellules dépourvues d'activité de la glucosylcéramide synthase suggère que ce soit également le cas pour les banyangvirus et phlébovirus [34]. Les auteurs montrent que le programme d'entrée du VFST, ainsi que celui du VHRT, sont grandement perturbés en absence de cette enzyme. La glucosylcéramide synthase participe à la maturation des céramides, et l'extinction de son activité aboutit à un changement majeur dans la composition lipidique de la

membrane plasmique et des vésicules endosomales qui en découlent.

Les motifs de la queue cytosolique des récepteurs définissent généralement l'identité de la voie endocytaire par laquelle le cargo est internalisé. Ces motifs servent de sites de liaison pour des protéines adaptatrices ayant des fonctions dans la signalisation, l'internalisation endocytaire et le trafic intracellulaire [18]. La queue cytosolique de DC-SIGN contient plusieurs de ces motifs, dont deux leucines (LL) critiques pour l'endocytose de la lectine et de ses cargos [35]. Les mutants de DC-SIGN, dépourvus des deux leucines, capturent le VUUK avec la même efficacité que la forme sauvage du récepteur [22]. Cependant, le virus n'est plus internalisé et l'infection avorte. Ce résultat démontre que DC-SIGN sert dans ce cas de récepteur endocytaire, et pas seulement de facteur d'attachement. Contrairement à DC-SIGN, la fonction endocytaire de L-SIGN n'est pas requise pour l'infection par le VUUK [30]. Les niveaux d'infection sont semblables que les cellules expriment la lectine de type sauvage ou son mutant déficient pour l'endocytose. Ceci indique une différence fondamentale dans l'utilisation de DC-SIGN et L-SIGN par les phlébovirus pour leur entrée cellulaire. Pour résumer, DC-SIGN est un récepteur endocytaire pour les phlébovirus alors que L-SIGN est un facteur d'attachement. Parmi les autres récepteurs connus pour les phlébovirus et banyangvirus, aucun motif de signalisation n'a encore été décrit pour jouer un rôle dans l'internalisation des virions et leur entrée productive.

Une étude récente suggère que le VFST empreinte la voie d'endocytose médiée par la clathrine pour entrer dans les cellules (*figure 2*) [36]. Dans des cellules exprimant DC-SIGN, des images de microscopie électronique montrent que des particules du VUUK entrent dans des endosomes recouverts de clathrine, mais pas uniquement [22]. Dans des cellules n'exprimant pas la lectine, de tels événements sont très rarement observables dans le cas du VUUK [37]. De plus, l'inactivation du gène de la chaîne lourde de la clathrine par des pARNi n'a pas d'impact significatif sur l'infection par le VUUK [37]. Il n'est pas clair non plus si le VFVR utilise la voie d'endocytose médiée par la clathrine pour entrer dans les cellules (*tableau 3*). Il a été proposé qu'une souche du virus génétiquement modifiée, et non transmissible, dépend de la clathrine pour établir l'infection. À l'inverse, deux études indépendantes suggèrent que la souche vaccinale MP12 pénètre dans les cellules par des mécanismes dépendants de la cavéoline pour l'une, ou par macropinocytose pour l'autre [38-40].

Au-delà de souligner l'importance du travail qui reste à effectuer pour mieux comprendre les mécanismes d'internalisation des phlébovirus, ces travaux révèlent très probablement la capacité de ces virus à utiliser des voies

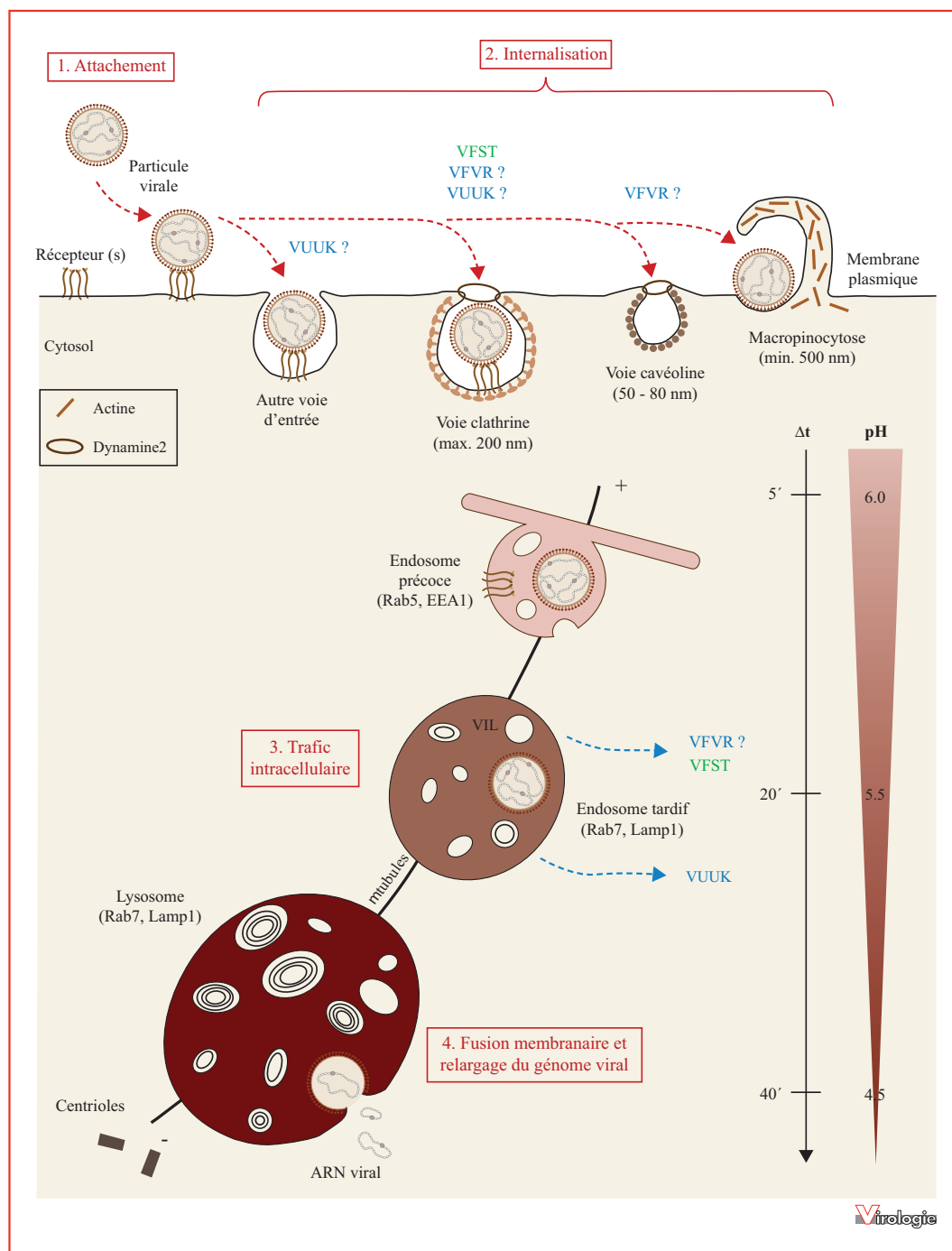


Figure 2. Internalisation et trafic intracellulaire des phlébovirus. L'entrée infectieuse des phlébovirus dans les cellules de mammifère implique diverses voies pinocytaires et dépend de la maturation endosomale, qui, elle-même, requiert des centaines de facteurs cellulaires. Les chemins d'entrée des phlébovirus les mieux caractérisés apparaissent en bleu. Celui du banyangvirus VFST apparaît en vert. Sur la droite, les échelles indiquent le temps mis par un cargo pour aller de la membrane plasmique à un compartiment endosomal (Δt) et l'acidité endosomale correspondante (pH). EEA1 : antigène endosome précoce 1 ; Lamp1 : protéine membranaire associée aux lysosomes 1 ; Rab5 et Rab7 : petites GTPases Rab 5 et 7 ; VFST : virus à fièvre sévère avec thrombocytopénie ; VFVR : virus de la fièvre de la vallée du Rift ; VIL : vésicule intraluminale ; VUUK : virus d'Uukuniemi. La figure est adaptée de la référence [16], avec l'autorisation de l'*American Society for Microbiology*.

Tableau 3 Facteurs et processus cellulaires impliqués dans l'entrée infectieuse des phlébovirus et des banyangvirus.

Isolats	Fusion, pénétration	Facteurs cellulaires dans l'entrée virale		Références
		Requis	Non requis	
VFST	pH ~ 5,6 > 60 min.	Actine, clathrine, dynamine2, glucosylcéramide synthase, microtubules, protéase à sérine, Rab5, Rab7 , vATPases	Gangliosides séries a et b, cathépsine B et L, cavéoline-1, cholestérol, lactosylcéramide synthase, PAK1, PI3K, Rab7	[23, 34, 36]
VFVR	pH ~ 5,7 16 – 24 min.	Actine , canaux Ca ²⁺ et K ⁺ , cavéoline-1, cholestérol , clathrine , dynamine2, échangeurs Na⁺/H⁺ , microtubules, PI3K , PKC, PLC, PP1/PP2A, RNASEK, vATPases	Actine , cholestérol , clathrine , échangeurs Na⁺/H⁺ , Eps15, PAK1, PI3K , Rac1	[38-40, 62]
VHRT		Glucosylcéramide synthase		[34]
VUUK	pH ~ 5,4 20 – 30 min.	BMP, clathrine, HDAC8, Lamp1, microtubules, PI3K, Rab5, RNASEK, température, VAMP3, vATPase	Rab7	[37, 45, 59, 63]

Les facteurs cellulaires en rouge ont été décrits par des études indépendantes comme étant soit requis soit inutiles dans l'entrée cellulaire du virus. BMP : bis(monoacylglycérol)phosphate ; HDAC8 : histone désacétylase 8 ; Lamp1 : protéine membranaire associée aux lysosomes 1 ; PAK1 : kinase1 activée par la p21 ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PLC : phospholipase C ; PKC : protéine kinase C ; PP1/PP2A : protéine phosphatase 1/ 2A ; Rab5 et 7 : petites GTPases Rab 5 et 7 ; RNASEK : ribonucléase K ; VAMP3 : protéine membranaire associée aux vésicules 3 ; vATPase : adénosine triphosphatase vacuolaire ; VFST : virus à fièvre sévère avec thrombocytopénie ; VFVR : virus de la fièvre de la vallée du Rift ; VHRT : virus Heartland ; VUUK : virus d'Uukuniemi.

endocytaires alternatives dans une même cellule, ou dans des tissus distincts. Cette possibilité est supportée par une accumulation croissante de données obtenues pour des virus non apparentés, tels que le virus de la grippe. La variété des processus endocytiques par lesquels les récepteurs viraux sont internalisés dans les cellules, ainsi que le profil d'expression de ces récepteurs à la surface cellulaire, influent certainement sur la capacité des phlébovirus à pénétrer dans leur cellule cible par une ou plusieurs voies d'endocytose.

Trafic intracellulaire des particules phlébovirales

Après qu'elles aient lié la surface cellulaire et soient internalisées dans la cellule, les particules phlébovirales sont dirigées dans des vésicules endosomales (*figure 2*). Dès lors, les virions circulent à travers la machinerie d'endocytose jusqu'à atteindre les compartiments endosomaux d'où ils vont pénétrer le cytosol. Le transport depuis les endosomes précoces vers les endosomes tardifs, puis les lysosomes, est un processus biologique complexe, hautement dynamique. Il implique des centaines de facteurs cellulaires avec

un large éventail de fonctions et, est encore loin d'être parfaitement compris [41]. Il s'accompagne d'un remodelage majeur de la composition en protéines et lipides, concomitant avec l'acidification du milieu luminal endosomal, d'un pH d'environ 6,5 dans les endosomes précoces à 5,5-4,5 dans les endosomes tardifs et les lysosomes (*figure 2*) [41]. L'acidité endosomale joue un rôle majeur dans l'activation d'une majorité de virus [42]. Nombreux sont les travaux démontrant que les phlébovirus dépendent de l'acidification dans les vésicules intracellulaires pour infecter la cellule hôte [23, 37-39]. Plusieurs phlébovirus sont sensibles à la neutralisation du pH endosomal par des bases faibles, tel que le chlorure d'ammonium, ou par des inhibiteurs des pompes à protons vacuolaires ATPases, comme la bafilomycine A1, et ce à des concentrations extrêmement basses (de l'ordre de mM et du nM, respectivement) comparées à d'autres virus non apparentés. Plusieurs études ont clairement établi que les phlébovirus transitent par les endosomes précoces durant leur voyage dans la machinerie d'endocytose (*figure 2*). L'expression de mutants dominants négatifs et constitutivement actif de Rab5, une petite GTPase nécessaire au trafic et à la maturation des endosomes précoces, interrompt le trafic intracellulaire du VUUK, et, par conséquent, bloque

l'infection par ce virus [37]. Des images de microscopie confocale montrent la présence de particules du VUUK et du VFST dans des endosomes précoces recouverts de Rab5 [36, 37]. Dans leur ensemble, les données supportent l'idée que les phlébovirus et les banyangvirus appartiennent à un large groupe de virus dont l'entrée infectieuse dépend de la maturation endosomale tardive, dits L-PV (de l'anglais *late-penetrating virus*) [42]. Plusieurs phlébovirus pénètrent le cytosol entre 20 et 60 minutes après le début de leur internalisation dans la cellule [36-38], un laps de temps compatible avec celui de la maturation des endosomes tardifs (figure 2) [42].

Les vésicules endosomales tardives sont connues pour se déplacer le long des microtubules depuis la périphérie de la cellule vers le noyau, un processus étroitement lié à leur maturation. La perturbation du réseau des microtubules par des molécules chimiques, comme le nocodazole et la colcémide, conduit à bloquer l'infection productive par le VUUK et le VFST [36, 37], signe que ces virus requièrent un réseau de microtubules intact pour infecter la cellule. Un autre élément supportant l'appartenance des phlébovirus et des banyangvirus au groupe des L-PV est que la fusion de leur enveloppe membranaire avec celle des endosomes est activée par l'acidité endosomale, pour des valeurs de pH inférieures à 5,7 [36-38, 43]. Cette acidité est typique des vésicules endosomales tardives [42].

Il existe donc de nombreuses évidences que les phlébovirus pénètrent leurs cellules cibles depuis des compartiments endosomaux tardifs. Le cheminement des particules phlébovirales dans la branche dégradative de la machinerie d'endocytose reste, cependant, mal caractérisé. Des particules du VUUK et du VFST ont été visualisées par microscopie confocale dans des vésicules intracellulaires arborant Rab7 [36, 37]. Cette petite GTPase est considérée par beaucoup comme la plus critique pour le trafic et la maturation des endosomes tardifs [44]. L'expression du mutant dominant négatif T22N de Rab7 n'a, cependant, aucun effet sur l'entrée infectieuse du VUUK alors que le mutant constitutivement actif semble faciliter l'infection [37]. La présence du VUUK et du VFST dans des endolysosomes [22, 36, 37] interroge sur le chemin emprunté par ces virus pour gagner ces compartiments de maturité plus tardive. La formation des vésicules endolysosomales résulte, au moins en partie, de la maturation des endosomes tardifs, elle-même sous contrôle de Rab7. Plusieurs raisons pourraient expliquer l'inefficacité des mutants à bloquer l'activité de Rab7 endogène, comme leur mauvaise localisation dans la cellule ou encore l'existence de plusieurs isoformes de Rab7. Il est, cependant, tentant de postuler que certains phlébovirus et banyangvirus puissent utiliser des voies alternatives, non décrites de la machinerie endocytaire tardive pour atteindre leur point d'entrée dans le cytosol.

Fusion et pénétration des phlébovirus dans le cytosol

Les virus entrant dans la cellule par endocytose doivent, en définitive, traverser la membrane des endosomes pour libérer leur génome et leurs protéines accessoires dans le cytosol. Les phlébovirus y parviennent par un mécanisme de fusion membranaire médié par la protéine G_C [26]. L'acidification s'avère suffisante pour déclencher la fusion du VFVR et du VUUK dans des approches *in vitro* sans cellule [38, 45]. D'ailleurs, l'exposition du VFVR à des tampons acides, en absence de toute membrane cible, conduit à d'importantes modifications des propriétés biochimiques de la glycoprotéine G_C [38]. L'acidité endosomale sert de signal majeur au déclenchement de la fusion de nombreux virus enveloppés mais, seule, est parfois insuffisante. Entre autres, des récepteurs intracellulaires, des lipides spécifiques dans les membranes endosomales cibles, ou encore un clivage protéolytique des protéines d'enveloppe virale sont parfois nécessaires [41]. Ainsi, en plus de l'acidification, la pénétration du VFST semble dépendre du clivage endosomal de ses glycoprotéines G_N et G_C par des protéases de la famille des cathepsines [23]. Aussi, le bis(monoacylglycérol)phosphate, un lipide constitutif de certaines populations d'endosomes tardifs, facilite la fusion du VUUK avec des liposomes [45].

La fusion des membranes virale et endosomale est un mécanisme étroitement coordonné dans le temps et l'espace [46]. Typiquement, durant ce processus, les complexes fusogéniques formés à la surface des virions par les protéines virales de fusion, ce qui inclut le peptide de fusion, subissent de multiples changements conformationnels. Ils ciblent et harponnent la bicouche lipidique de l'endosome puis, progressivement, tirent les membranes de l'endosome et du virion l'une vers l'autre, par étapes successives d'apposition étroite, d'hémifusion, et de fusion [41, 46, 47], faisant intervenir le peptide de fusion. Il en résulte l'ouverture de pores dans la membrane endosomale par lesquels le matériel viral est libéré dans le cytosol. La cellule est alors infectée et la réplication virale peut débuter.

Il existe au moins trois classes distinctes de protéines virales capables de médier la fusion membranaire (classes I à III), chacune avec des spécificités mécanistiques et structurales propres [46]. Des progrès importants ont été réalisés ces dernières années dans la caractérisation structurale de la glycoprotéine de fusion G_C des phlébovirus. La structure cristallographique de l'ectodomaine de la protéine G_C du VFVR a été obtenue récemment dans ses deux états, pré- et post-fusion, avec une résolution inférieure à 2,0 Å [48, 49]. La structure de la forme post-fusion de G_C a également été déterminée pour les banyangvirus VFST et VHRT [50, 51]. L'ensemble de ces données indique que la glycoprotéine

virale G_C des phlébovirus et des banyangvirus adopte une conformation très similaire à celle des protéines de fusion membranaire de classe II [11].

Dernièrement, l'ectodomaine de la glycoprotéine G_N du VFVR et du VFST a été cristallisé et analysé par rayons X [26, 52], posant un regard neuf sur l'organisation structurale globale des particules phlébovirales et banyangvirales ainsi que sur leur probable mécanisme de fusion. Il a ainsi été possible d'apposer les structures cristallines de G_N et G_C du VFVR sur des reconstructions tomographiques de particules virales au début et à la fin de la fusion membranaire [26]. À l'aide de simulations informatiques pour prédire le passage d'une structure à l'autre, un modèle de fusion a été proposé. Lorsque le virus est dans un milieu à pH neutre, G_N protège le peptide de fusion hydrophobe de la glycoprotéine G_C . G_N aurait ainsi un rôle protecteur, empêchant une fusion prématurée des virions lors du passage dans l'appareil de Golgi et la sortie cellulaire. Une fois les particules virales dans le lumen endosomal, à proximité d'une membrane cible et à un pH inférieur à 5,7, G_N se réoriente vers les côtés. G_C est alors libérée et s'étend vers le feuillet extérieur de la membrane endosomale cible pour y insérer son peptide de fusion. Ce modèle est finalement très semblable à celui proposé pour la fusion des flavivirus, des virus enveloppés de classe II non apparentés aux phlébovirus [46]. De façon intéressante, il a été rapporté récemment que des anticorps neutralisants l'infection par le VFVR bloquent le réarrangement fusogénique du réseau G_N - G_C en ciblant le domaine distal de G_N [53].

L'ectodomaine des protéines de fusion de classe II comporte trois sous-domaines (I à III) et est relié à une queue cytosolique transmembranaire par une courte tige [47]. Des peptides analogues du domaine III et de la tige ont été utilisés avec succès pour bloquer l'infection par des flavivirus mais aussi par d'autres virus de classe II, comme les alphavirus [54, 55]. Il a été démontré que de tels peptides interfèrent avec des interactions intramoléculaires dans les protéines virales de fusion, lors des réarrangements conformationnels menant à la fusion membranaire. La présence de ces peptides maintient sans doute la protéine de fusion dans une conformation intermédiaire, précédant l'étape de post-fusion, et empêche ainsi la fusion membranaire et l'infection virale. Des stratégies similaires ont été employées avec certains phlébovirus et ont donné des résultats identiques. Ainsi, des peptides dirigés contre la tige de la glycoprotéine G_C bloquent l'infection par le VFVR [56]. Des histidines dans les protéines de fusion, y compris dans celles de classe II d'origine virale, servent de capteur d'acidification dans le lumen endosomal. Ces résidus définissent souvent le pH optimal de la fusion virale [57]. L'environnement local de ces histidines influe sur leur pK_a , avec des valeurs aussi larges que 4,5-7,3, et, *in fine*, sur le

pH optimal pour la fusion des particules virales [58]. De tels résidus histidines ont été identifiés dans la glycoprotéine G_C du VFVR par analyse mutationnelle [38]. Le pH optimal de pénétration a été déterminé pour plusieurs phlébovirus et banyangvirus par des approches consistant à mesurer la fusion entre virus et liposomes, virus et cellules, ou encore, entre cellules lorsqu'elles expriment les glycoprotéines G_N et G_C à leur surface. L'activation de la fusion se produit ainsi à un pH de 5,4 pour le VUUK, 5,6 pour le VFST et 5,7 pour le VFVR [36-38, 45]. En fin de compte, le principal facteur de l'activation de la fusion de la plupart des phlébovirus semble être le pH endosomal.

Conclusion et perspectives

Dans cette revue, nous avons résumé les connaissances actuelles sur les interactions précoces entre les phlébovirus et leurs cellules cibles, de l'attachement de ces virus à la surface cellulaire jusqu'à leur fusion et pénétration dans le cytosol. Il est évident que des centaines de facteurs cellulaires, avec un large éventail de fonctions biologiques, sont impliqués dans le processus d'entrée infectieuse des phlébovirus. Bien que chaque isolat présente très probablement des spécificités et des besoins distincts, il semble que de nombreux phlébovirus dépendent de la maturation endosomale tardive pour infecter leur cellule cible. Il est toutefois évident que de nombreux aspects de la pénétration des phlébovirus restent à élucider. Des criblages à haut débit visant à inactiver chaque gène du génome humain, *via* l'utilisation, par exemple, de cellules haploïdes et de pARNi ou du système CRISPR/Cas9, devraient aider à identifier de nouveaux facteurs et processus cellulaires importants pour l'entrée infectieuse des phlébovirus. De telles approches ont notamment commencé à être utilisées pour le VFVR et le VUUK [21, 59, 60].

Pour cibler et infecter un grand nombre de tissus et d'espèces différentes, les phlébovirus sont capables d'utiliser plusieurs récepteurs. Quelques-uns ont été découverts chez l'homme et d'autres vertébrés mais aucun chez les arthropodes. Une analyse détaillée des récepteurs de ces virus, autant chez les hôtes vertébrés qu'arthropodes, s'avère donc primordiale pour mieux comprendre les processus d'infection sous-jacents. Par conséquent, seule l'utilisation combinée de nouveaux modèles *in vitro* avec des approches *ex vivo* et *in vivo* permettra d'améliorer nos connaissances de la transmission, de l'entrée et de la propagation des phlébovirus.

La caractérisation des particules virales, transmises par les arthropodes aux mammifères, est aussi un objectif important. La biologie cellulaire chez les arthropodes diffère significativement de celle des mammifères. La compo-

tion en lipides de l'enveloppe virale, ainsi que la nature des oligosaccharides dans les glycoprotéines à la surface des virions, sont des facteurs à même d'influencer les interactions avec les récepteurs, les mécanismes d'endocytose, et la fusion membranaire. Par exemple, il a été montré que la glycosylation et la conformation de la glycoprotéine G_N du VUUK diffèrent grandement selon que le virus est produit en cellules de tique ou de mammifère [61]. De plus, le virus dérivant de cellules de tique présente une plus grande facilité à infecter des cellules de mammifère que son équivalent amplifié en cellules de mammifère [61]. Trop souvent les études portant sur les phlébovirus impliquent des stocks de virus issus de cellules de mammifère, moins pertinents pour étudier la transmission virale et les étapes précoces de l'infection.

Idéalement, prévenir la dissémination des phlébovirus requière des approches ciblant les premières étapes de l'infection. Une meilleure connaissance du spectre d'hôtes et du spectre tissulaire est essentielle, mais pas seulement. Les mécanismes utilisés par ces virus, au niveau moléculaire et cellulaire, pour infecter leur cellule cible doivent également être mieux définis. Trop souvent les études dans ce domaine ne s'appuient que sur une seule approche, ou pire, un seul inhibiteur. Un inhibiteur ne suffit pas à lui seul pour définir avec précision une voie cellulaire. Les inhibiteurs ont très souvent de nombreux effets secondaires, ou simplement, altèrent différents processus dans la cellule. Seule une combinaison d'inhibiteurs au profil bien défini, utilisés dans des approches complémentaires qualitatives et quantitatives pour visualiser et analyser les premières minutes de l'infection, permettra d'élucider les mécanismes d'entrée des phlébovirus. Ici sont les clés pour améliorer notre connaissance de la dissémination de ces virus et, *in fine*, développer de nouvelles stratégies antivirales.

Remerciements. Ce travail a été soutenu par des fonds Cell-Networks Research Group ainsi que des financements de la DFG (LO-2338/1-1 et LO-2338/3-1) attribués à Pierre-Yves Lozach. Ce travail a, en plus, été partiellement financé par une subvention de Conicyt (Chile) Programa de Apoyo a Centros con Financiamiento Basal AFB 170004 attribué à Nicole D. Tischler.

Liens d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Maes P, Adkins S, Alkhovsky SV, *et al.* Taxonomy of the order Bunyavirales: second update 2018. *Arch Virol* 2019 ; 164(3) : 927-41.
2. Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nuclei Acids Res* 2018 ; 46 : 10.1093/nar/gkx932.
3. Leger P, Lozach PY. Bunyaviruses: from transmission by arthropods to virus entry into the mammalian host first-target cells. *Future Virol* 2015 ; 10(7) : 859-81.
4. World Health Organization. *Workshop on prioritization of pathogens. Blueprint for R&D preparedness and response to public health emergencies due to highly infectious pathogens*. World Health Organization, 2015.
5. Linthicum KJ, Britch SC, Anyamba A. Rift Valley fever: an emerging mosquito-borne disease. *Annu Rev Entomol* 2016 ; 61 : 395-415.
6. Moriconi M, Rugna G, Calzolari M, *et al.* Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: human leishmaniasis and phlebovirus infections. *PLoS Negl Trop Dis* 2017 ; 11(8) : e0005660.
7. Rezelj VV, Overby AK, Elliott RM. Generation of mutant Uukuniemi viruses lacking the nonstructural protein NSs by reverse genetics indicates that NSs is a weak interferon antagonist. *J Virol* 2015 ; 89(9) : 4849-56.
8. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, *et al.* Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med* 2011 ; 364(16) : 1523-32.
9. McMullan LK, Folk SM, Kelly AJ, *et al.* A new phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *N Engl J Med* 2012 ; 367(9) : 834-41.
10. Elliott RM, Brennan B. Emerging phleboviruses. *Curr Opin Virol* 2014 ; 5 : 50-7.
11. Guardado-Calvo P, Rey FA. The envelope proteins of the Bunyavirales. *Adv Virus Res* 2017 ; 98 : 83-118.
12. Spiegel M, Plegge T, Pohlmann S. The role of phlebovirus glycoproteins in viral entry, assembly and release. *Viruses* 2016 ; 8(7) : 202.
13. Hornak KE, Lanchy JM, Lodmell JS. RNA encapsidation and packaging in the phleboviruses. *Viruses* 2016 ; 8(7).
14. Eifan S, Schnettler E, Dietrich I, Kohl A, Blomstrom AL. Non-structural proteins of arthropod-borne bunyaviruses: roles and functions. *Viruses* 2013 ; 5(10) : 2447-68.
15. Overby AK, Pettersson RF, Grunewald K, Huiskonen JT. Insights into bunyavirus architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 ; 105(7) : 2375-9.
16. Freiberg AN, Sherman MB, Morais MC, Holbrook MR, Watowich SJ. Three-dimensional organization of Rift Valley fever virus revealed by cryoelectron tomography. *J Virol* 2008 ; 82(21) : 10341-8.
17. Huiskonen JT, Overby AK, Weber F, Grunewald K. Electron cryo-microscopy and single-particle averaging of Rift Valley fever virus: evidence for GN-GC glycoprotein heterodimers. *J Virol* 2009 ; 83(8) : 3762-9.
18. Boulant S, Stanifer M, Lozach PY. Dynamics of virus-receptor interactions in virus binding, signaling and endocytosis. *Viruses* 2015 ; 7(6) : 2794-815.
19. de Boer SM, Kortekaas J, de Haan CA, Rottier PJ, Moormann RJ, Bosch BJ. Heparan sulfate facilitates Rift Valley fever virus entry into the cell. *J Virol* 2012 ; 86(24) : 13767-71.
20. Pietrantoni A, Fortuna C, Remoli ME, Ciufolini MG, Superti F. Bovine lactoferrin inhibits Toscana virus infection by binding to heparan sulphate. *Viruses* 2015 ; 7(2) : 480-95.
21. Riblett AM, Blomen VA, Jae LT, *et al.* A haploid genetic screen identifies heparan sulfate proteoglycans supporting Rift Valley fever virus infection. *J Virol* 2016 ; 90(3) : 1414-23.
22. Lozach PY, Kuhbacher A, Meier R, *et al.* DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. *Cell Host Microbe* 2011 ; 10(1) : 75-88.
23. Hofmann H, Li X, Zhang X, *et al.* Severe fever with thrombocytopenia virus glycoproteins are targeted by neutralizing antibodies and can use DC-SIGN as a receptor for pH-dependent entry into human and animal cell lines. *J Virol* 2013 ; 87(8) : 4384-94.
24. Tani H, Shimajima M, Fukushi S, *et al.* Characterization of glycoprotein-mediated entry of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J Virol* 2016 ; 90(11) : 5292-301.

25. Svajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal* 2010; 22(10): 1397-405.
26. Halldorsson S, Li S, Li M, Harlos K, Bowden TA, Huiskonen JT. Shielding and activation of a viral membrane fusion protein. *Nat Commun* 2018; 9(1): 349.
27. Phoenix I, Nishiyama S, Lokugamage N, et al. N-glycans on the Rift Valley fever virus envelope glycoproteins Gn and Gc redundantly support viral infection via DC-SIGN. *Viruses* 2016; 8(5): 149.
28. Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, et al. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell* 2006; 124(3): 485-93.
29. Pustynnikov S, Sagar D, Jain P, Khan ZK. Targeting the C-type lectins-mediated host-pathogen interactions with dextran. *J Pharm Pharm Sci* 2014; 17(3): 371-92.
30. Leger P, Tetard M, Youness B, et al. Differential use of the C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN for phlebovirus endocytosis. *Traffic* 2016; 17(6): 639-56.
31. Sun Y, Qi Y, Liu C, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA is a critical factor contributing to the efficiency of early infection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J Virol* 2014; 88(1): 237-48.
32. Silvas JA, Popov VL, Paulucci-Holthauzen A, Aguilar PV. Extracellular vesicles mediate receptor-independent transmission of novel tick-borne bunyavirus. *J Virol* 2016; 90(2): 873-86.
33. Hoffmann AB, Mazelier M, Leger P, Lozach PY. Deciphering virus entry with fluorescently labeled viral particles. *Methods Mol Biol* 2018; 1836: 159-83.
34. Drake MJ, Brennan B, Briley Jr. K, et al. A role for glycolipid biosynthesis in severe fever with thrombocytopenia syndrome virus entry. *PLoS Pathog* 2017; 13(4): e1006316.
35. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem* 2005; 280(25): 23698-708.
36. Liu J, Xu M, Tang B, et al. Single-particle tracking reveals the sequential entry process of the bunyavirus severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Small* 2019; 15(6): e1803788.
37. Lozach PY, Mancini R, Bitto D, et al. Entry of bunyaviruses into mammalian cells. *Cell Host Microbe* 2010; 7(6): 488-99.
38. de Boer SM, Kortekaas J, Spel L, Rottier PJ, Moormann RJ, Bosch BJ. Acid-activated structural reorganization of the Rift Valley fever virus Gc fusion protein. *J Virol* 2012; 86(24): 13642-52.
39. Harmon B, Schudel BR, Maar D, et al. Rift Valley fever virus strain MP-12 enters mammalian host cells via caveola-mediated endocytosis. *J Virol* 2012; 86(23): 12954-70.
40. Filone CM, Hanna SL, Caino MC, Bambina S, Doms RW, Cherry S. Rift Valley fever virus infection of human cells and insect hosts is promoted by protein kinase C epsilon. *PLoS One* 2010; 5(11): e15483.
41. White JM, Whittaker GR. Fusion of enveloped viruses in endosomes. *Traffic* 2016; 17(6): 593-614.
42. Lozach PY, Huotari J, Helenius A. Late-penetrating viruses. *Curr Opin Virol* 2011; 1(1): 35-43.
43. Liu L, Celma CC, Roy P. Rift Valley fever virus structural proteins: expression, characterization and assembly of recombinant proteins. *Virol J* 2008; 5: 82.
44. Wang T, Ming Z, Xiaochun W, Hong W. Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. *Cell Signal* 2011; 23(3): 516-21.
45. Bitto D, Halldorsson S, Caputo A, Huiskonen JT. Low pH and anionic lipid-dependent fusion of Uukuniemi phlebovirus to liposomes. *J Biol Chem* 2016; 291(12): 6412-22.
46. Harrison SC. Viral membrane fusion. *Virology* 2015; 479-480: 498-507.
47. Kielian M. Mechanisms of virus membrane fusion proteins. *Annu Rev Virol* 2014; 1(1): 171-89.
48. Dessau M, Modis Y. Crystal structure of glycoprotein C from Rift Valley fever virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(5): 1696-701.
49. Guardado-Calvo P, Atkovska K, Jeffers SA, et al. A glycerophospholipid-specific pocket in the RVFV class II fusion protein drives target membrane insertion. *Science* 2017; 358(6363): 663-7.
50. Halldorsson S, Behrens AJ, Harlos K, et al. Structure of a phleboviral envelope glycoprotein reveals a consolidated model of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(26): 7154-9.
51. Zhu Y, Wu Y, Chai Y, et al. The postfusion structure of the Heartland virus Gc glycoprotein supports taxonomic separation of the bunyaviral families Phenuiviridae and Hantaviridae. *J Virol* 2018; 92(1): e01558-1617.
52. Wu Y, Zhu Y, Gao F, et al. Structures of phlebovirus glycoprotein Gn and identification of a neutralizing antibody epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114(36): E7564-73.
53. Allen ER, Krumm SA, Raghvani J, et al. A protective monoclonal antibody targets a site of vulnerability on the surface of Rift Valley fever virus. *Cell Rep* 2018; 25(13): 3750-58 e4.
54. Liao M, Kielian M. Domain III from class II fusion proteins functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion. *J Cell Biol* 2005; 171(1): 111-20.
55. Schmidt AG, Yang PL, Harrison SC. Peptide inhibitors of dengue virus entry target a late-stage fusion intermediate. *PLoS Pathog* 2010; 6(4): e1000851.
56. Koehler JW, Smith JM, Ripoll DR, et al. A fusion-inhibiting peptide against Rift Valley fever virus inhibits multiple, diverse viruses. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(9): e2430.
57. Kampmann T, Mueller DS, Mark AE, Young PR, Kobe B. The role of histidine residues in low-pH-mediated viral membrane fusion. *Structure* 2006; 14(10): 1481-7.
58. Edgcomb SP, Murphy KP. Variability in the pKa of histidine side-chains correlates with burial within proteins. *Proteins* 2002; 49(1): 1-6.
59. Meier R, Franceschini A, Horvath P, et al. Genome-wide small interfering RNA screens reveal VAMP3 as a novel host factor required for Uukuniemi virus late penetration. *J Virol* 2014; 88(15): 8565-78.
60. Hopkins KC, McLane LM, Maqbool T, Panda D, Gordesky-Gold B, Cherry S. A genome-wide RNAi screen reveals that mRNA decapping restricts bunyaviral replication by limiting the pools of Dcp2-accessible targets for cap-snatching. *Genes Dev* 2013; 27(13): 1511-25.
61. Mazelier M, Rouxel RN, Zumstein M, Mancini R, Bell-Sakyi L, Lozach PY. Uukuniemi virus as a tick-borne virus model. *J Virol* 2016; 90(15): 6784-98.
62. Hackett BA, Yasunaga A, Panda D, et al. RNASEK is required for internalization of diverse acid-dependent viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(25): 7797-802.
63. Yamauchi Y, Boukari H, Banerjee I, Sbalzarini IF, Horvath P, Helenius A. Histone deacetylase 8 is required for centrosome cohesion and influenza A virus entry. *PLoS Pathog* 2011; 7(10): e1002316.