

1 **Entrée cellulaire des phlébovirus chez l'hôte mammifère**

2 **Zina M. Uckeley^{1,#}, Jana Koch^{1,#}, Nicole Tischler², Pylvia Léger¹ et Pierre-Yves Lozach^{1,3,*}**

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

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

7 ³IVPC UMR754, INRA, Univ. Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, EPHE, 50 Av. Tony
8 Garnier, 69007 Lyon, France

9 [#]Ces auteurs ont contribué à ce travail de façon équivalente.

10 ^{*}Correspondance : pierre-yves.lozach@med.uni-heidelberg.de ; Tel : +49-(0)6221-56-1328

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

23 **Mots clefs :** arbovirus ; arthropode ; banyangvirus ; bunyavirus ; endocytose ; entrée cellulaire ;
24 fusion ; phlébovirus ; récepteur ; Rift ; Toscana ; Uukuniemi ; virus à ARN ; VFST

25 **Cell biology of phlebovirus entry**

26 **Zina M. Uckeley^{1,#}, Jana Koch^{1,#}, Nicole Tischler², Pysylvia Léger¹ and Pierre-Yves Lozach^{1,3,*}**

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

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

31 ³IVPC UMR754, INRA, Univ. Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, EPHE, 50 Av. Tony
32 Garnier, 69007 Lyon, France

33 [#]The authors equally contributed to this work.

34 ^{*}Correspondence: pierre-yves.lozach@med.uni-heidelberg.de ; Tel : +49-(0)6221-56-1328

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

44 **Keywords:** arbovirus; arthropod; banyangvirus; bunyavirus; cell entry; endocytosis; fusion;
45 phlebovirus; receptor; Rift; RNA virus; SFTSV; Toscana; Uukuniemi

46 **Introduction**

47 Au sein de la famille virale des *Phenuiviridae* dans l'ordre des *Bunyavirales* (**Tableau 1**), le genre
48 *Phlebovirus* comprend plus de 50 isolats [1, 2]. Ces virus, présents dans le monde entier, infectent
49 un large spectre d'hôtes et sont essentiellement transmis par des phlébotomes et tiques, plus
50 rarement par des moustiques [3]. Plusieurs membres causent chez les animaux d'élevage et
51 l'homme de graves maladies, souvent mortelles, comme des hépatites, encéphalites et fièvres
52 hémorragiques. Certains sont classés comme armes biologiques par l'armée américaine et
53 requièrent des niveaux élevés de biosécurité pour pouvoir être étudiés. Plusieurs figurent sur la liste
54 des agents pathogènes hautement prioritaires de l'Organisation Mondiale de la Santé [4]. Aucun
55 vaccin ou traitement n'est actuellement approuvé pour un usage chez l'homme.

56 Avec l'activité humaine et le réchauffement climatique qui favorisent la dissémination de leurs
57 vecteurs vers de nouvelles régions, les foyers d'infection à phlébovirus ne se limitent plus aux pays
58 tropicaux ou en voie de développement. Un exemple récent est le virus de la fièvre de la vallée du
59 Rift (VFVR), un phlébovirus propagé par des moustiques qui est responsable de fièvres
60 hémorragiques et de malformations fœtales chez l'homme et les animaux domestiques [5]. Le virus
61 s'est répandu à travers l'Afrique puis vers l'Arabie Saoudite et Madagascar au cours des dernières
62 décennies. Il présente désormais un risque d'introduction dans le sud de l'Europe. Une autre
63 illustration de la propagation de ces pathogènes est le phlébovirus de Toscana (VTOS), un agent
64 pathogène transmis par des phlébotomes causant des méningo-encéphalites chez l'homme [6]. Le
65 VTOS a émergé dans le bassin méditerranéen dans les années 70 et cause un nombre croissant de
66 foyers d'infection en Espagne, en Italie et dans le sud de la France.

67 Les phlébovirus représentent une menace mondiale pour le bétail, la productivité agricole et
68 la santé publique. Ils doivent être sérieusement considérés comme des agents potentiels de maladies
69 émergentes et ré-émergentes. La plupart des informations disponibles sur ces virus proviennent
70 d'études portant sur un nombre limité d'isolats, principalement le VFVR et le virus d'Uukuniemi
71 (VUUK), un phlébovirus transmis par des tiques. Le VUUK n'est associé à aucune maladie connue
72 chez l'homme et a longtemps servi, et sert encore, de modèle pour étudier les phlebovirus les plus
73 dangereux [7]. De nombreux aspects fondamentaux de la biologie cellulaire des phlébovirus restent
74 à élucider, en particulier, en ce qui concerne les étapes initiales de l'infection. Comprendre les
75 processus d'entrée dans la cellule hôte est un prérequis évident pour pouvoir développer des
76 traitements efficaces contre les infections phlébovirales actuelles et futures.

77 Dans cette revue, nous traitons les connaissances et les avancées les plus récentes concernant
78 le programme d'entrée cellulaire des phlébovirus chez leur hôte mammifère, depuis leur liaison à
79 la surface de la cellule jusqu'à leur pénétration dans le cytosol. Les mécanismes d'entrée des virus
80 à fièvre sévère avec thrombocytopénie (VFST) et Heartland (VHRT), apparus en Asie et en
81 Amérique du Nord il y a une décennie [8, 9], seront également abordés. Bien que le VFST et le
82 VHRT appartiennent désormais au genre des *Banyangvirus* (**Tableau 1**) [2], ils sont très proches
83 au niveau moléculaire et cellulaire des phlébovirus, et plus particulièrement, du VUUK [7]. Comme
84 ce dernier, ils sont également transmis par des tiques. A leur découverte, le VFST et le VHRT ont
85 été classés parmi les phlébovirus et ce n'est que très récemment qu'ils se sont vus attribuer leur
86 propre genre [2]. D'ailleurs, certains continuent de les considérer comme des phlébovirus [1].

87 **Organisation génomique et structurale des particules phlébovirales**

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

99 Le plus petit segment, S, code pour la nucléoprotéine N qui constitue, avec la polymérase et
100 l'ARN viral, les ribonucléoprotéines trouvées à l'intérieur des virions (**Figure 1A**) [10]. Les
101 phlébovirus ne possèdent pas de matrice classique ou de structure interne rigide. La protéine N
102 joue donc un rôle important dans la protection de l'information génétique de ces virus. Au cours
103 des dernières années, la structure cristalline de la protéine N a été résolue pour plusieurs
104 phlébovirus, fournissant de nouvelles informations sur les mécanismes d'assemblage des
105 ribonucléoprotéines [13]. Les phlébovirus encodent également une à deux protéines non

106 structurales, NSs et NSm, mais jusqu'à présent, aucune des deux n'a été impliquée dans l'entrée
107 cellulaire des virions et ne seront donc pas discutées ici [14].

108 A la surface des particules virales, les deux glycoprotéines d'enveloppe G_N et G_C sont
109 responsables de la liaison des virions aux cellules cibles puis de leur pénétration dans le cytosol
110 [3]. Des micrographies électroniques montrent que les particules phlébovirales sont globalement
111 sphériques et de taille hétérogène, avec un diamètre compris entre 80 et 160 nm [10]. Des études
112 récentes de cryo-tomographie électronique ont confirmé le degré élevé de pléomorphisme
113 précédemment observé pour les phlébovirus [15-17]. Des analyses ultra-structurales du VFVR et
114 du VUUK ont révélé que les particules les plus régulières présentent à leur surface des
115 protubérances formant un réseau icosaédrique avec une triangulation atypique de type $T = 12$
116 (**Figure 1C**) [15-17].

117 **Récepteurs cellulaires des phlébovirus chez l'hôte mammifère**

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

129 Les interactions entre virus et récepteurs sont souvent spécifiques et multivalentes. La liaison
130 à plusieurs molécules d'un même récepteur, regroupées au sein de microdomaines, peut accroître
131 l'avidité d'interactions de faible affinité [18]. Par exemple, les glycoprotéines et les glycolipides
132 présents dans la matrice extracellulaire de la plupart des cellules de mammifères constituent des
133 structures hautement polaires. Malgré des interactions de faible affinité, du fait de leur nature
134 électrostatique, ces structures servent de site d'attachement pour de nombreux virus, dont les
135 phlébovirus. Il a été montré que des glycosaminoglycanes (GAG), tels que les héparanes sulfates,

136 facilitent les infections par le VFVR et le VTOS [19-21]. L'infection par ces deux virus est ainsi
137 fortement réduite en présence d'héparine, un compétiteur des GAG à la surface des cellules. De
138 plus, la digestion enzymatique des héparanes sulfates à la surface cellulaire, préalablement à
139 l'exposition des cellules aux virus, produit des résultats similaires. Enfin, des cellules déficientes
140 pour la synthèse des héparanes sulfates affichent une moindre sensibilité au VFVR [19, 21]. De
141 façon intéressante, les glycoprotéines de la souche du VFVR amplifiée en culture cellulaire, et
142 utilisée dans l'une de ces études, ne diffèrent pas dans leur composition en acides aminés basiques
143 de celles des virus isolés à partir d'animaux infectés [19]. Ce résultat suggère que la dépendance
144 du VFVR aux héparanes sulfates ne résulte pas de l'adaptation du virus à la culture cellulaire.
145 Cependant, le fait que certains types de cellule demeurent permissives à l'infection, même
146 dépourvues de GAG, indique que les phlébovirus peuvent utiliser des récepteurs alternatifs.

147 Un certain nombre d'évidences indique que plusieurs phlébovirus sont capables d'utiliser la
148 lectine humaine de type C, DC-SIGN, pour cibler et infecter les cellules dendritiques (CD) du
149 derme [22]. En présence d'anticorps neutralisants, les CD dermiques deviennent résistantes à
150 l'infection par le VFVR et le VUUK [22]. L'expression de DC-SIGN à la membrane plasmique
151 confère à des cellules originellement peu permissives une très grande sensibilité à de nombreux
152 phlébovirus dont le VFVR, le VUUK, le VTOS et Punta Toro [22]. La liste des phlébovirus décrits
153 pour interagir avec DC-SIGN a depuis été étendue aux banyangvirus. Deux études récentes
154 démontrent, entre autre, que la lectine facilite l'infection par des particules rhabdovirales
155 pseudotypées avec les glycoprotéines du VFST [23, 24]. DC-SIGN représente un candidat
156 moléculaire intéressant pour faire le lien entre les virus provenant d'arthropodes et l'infection
157 initiale dans la peau de l'hôte humain. Ce récepteur immun est (i) principalement exprimé à la
158 surface des CD dermiques immatures, présentes dans le site anatomique de la transmission de ces
159 virus, et (ii) spécialisé dans la capture d'antigènes étrangers à forte teneur en résidus mannose, tels
160 ceux trouvés dans les glycoprotéines de virus amplifiés en insectes [3, 25]. Pour ces raisons, les
161 interactions entre DC-SIGN et les agents pathogènes transmis par des insectes et tiques sont
162 considérées comme les plus pertinentes ; bien que plusieurs études aient suggéré un rôle de la
163 lectine dans l'infection par divers microbes ne se propageant pas *via* des arthropodes [25].

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

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

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

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

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

197 **Internalisation des phlébovirus dans la cellule**

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

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

223 Les motifs de la queue cytosolique des récepteurs définissent généralement l'identité de la voie
224 endocytairre par laquelle le cargo est internalisé. Ces motifs servent de sites de liaison pour des
225 protéines adaptatrices ayant des fonctions dans la signalisation, l'internalisation endocytairre et le
226 trafic intracellulaire [18]. La queue cytosolique de DC-SIGN contient plusieurs de ces motifs, dont
227 deux leucines (LL) critiques pour l'endocytose de la lectine et de ses cargos [35]. Les mutants de

228 DC-SIGN, dépourvus des deux leucines, capturent le VUUK avec la même efficacité que la forme
229 sauvage du récepteur [22]. Cependant, le virus n'est plus internalisé et l'infection avorte. Ce résultat
230 démontre que DC-SIGN sert dans ce cas de récepteur endocytaire, et pas seulement de facteur
231 d'attachement. Contrairement à DC-SIGN, la fonction endocytaire de L-SIGN n'est pas requise
232 pour l'infection par le VUUK [30]. Les niveaux d'infection sont semblables que les cellules
233 expriment la lectine de type sauvage ou son mutant déficient pour l'endocytose. Ceci indique une
234 différence fondamentale dans l'utilisation de DC-SIGN et L-SIGN par les phlébovirus pour leur
235 entrée cellulaire. Pour résumer, DC-SIGN est un récepteur endocytaire pour les phlébovirus alors
236 que L-SIGN est un facteur d'attachement. Parmi les autres récepteurs connus pour les phlébovirus
237 et banyangvirus, aucun motif de signalisation n'a encore été décrit pour jouer un rôle dans
238 l'internalisation des virions et leur entrée productive.

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

251 Au-delà de souligner l'importance du travail qui reste à effectuer pour mieux comprendre les
252 mécanismes d'internalisation des phlébovirus, ces travaux révèlent très probablement la capacité
253 de ces virus à utiliser des voies endocytaires alternatives dans une même cellule, ou dans des tissus
254 distincts. Cette possibilité est supportée par une accumulation croissante de données obtenues pour
255 des virus non apparentés, tel que le virus de la grippe. La variété des processus endocytiques par
256 lesquels les récepteurs viraux sont internalisés dans les cellules, ainsi que le profil d'expression de
257 ces récepteurs à la surface cellulaire, influent certainement sur la capacité des phlébovirus à
258 pénétrer dans leur cellule cible par une ou plusieurs voies d'endocytose.

259 **Trafic intracellulaire des particules phlébovirales**

260 Après qu'elles aient lié la surface cellulaire et soient internalisées dans la cellule, les particules
261 phlébovirales sont dirigées dans des vésicules endosomales (**Figure 2**). Dès lors, les virions
262 circulent à travers la machinerie d'endocytose jusqu'à atteindre les compartiments endosomaux
263 d'où ils vont pénétrer le cytosol. Le transport depuis les endosomes précoces vers les endosomes
264 tardifs, puis les lysosomes, est un processus biologique complexe, hautement dynamique. Il
265 implique des centaines de facteurs cellulaires avec un large éventail de fonctions et, est encore loin
266 d'être parfaitement compris [41]. Il s'accompagne d'un remodelage majeur de la composition en
267 protéines et lipides, concomitant avec l'acidification du milieu luminal endosomal, d'environ 6,5
268 dans les endosomes précoces à 5,5 – 4,5 dans les endosomes tardifs et les lysosomes (**Figure 2**)
269 [41]. L'acidité endosomale joue un rôle majeur dans l'activation d'une majorité de virus [42].
270 Nombreux sont les travaux démontrant que les phlébovirus dépendent de l'acidification dans les
271 vésicules intracellulaires pour infecter la cellule hôte [23, 37-39]. Plusieurs phlébovirus sont
272 sensibles à la neutralisation du pH endosomal par des bases faibles, tel que le chlorure
273 d'ammonium, ou par des inhibiteurs des pompes à protons vacuolaires ATPases, comme la
274 bafilomycine A1, et ce, à des concentrations extrêmement basses (de l'ordre du mM et du nM,
275 respectivement) comparées à d'autres virus non apparentés.

276 Plusieurs études ont clairement établi que les phlébovirus transitent par les endosomes
277 précoces durant leur voyage dans la machinerie d'endocytose (**Figure 2**). L'expression de mutants
278 dominants négatifs et constitutivement actif de Rab5, une petite GTPase nécessaire au trafic et à la
279 maturation des endosomes précoces, interrompt le trafic intracellulaire du VUUK, et par
280 conséquent, bloque l'infection par ce virus [37]. Des images de microscopie confocale montrent la
281 présence de particules du VUUK et du VFST dans des endosomes précoces décorés de Rab5 [36,
282 37]. Dans leur ensemble, les données supportent l'idée que les phlébovirus et les banyangvirus
283 appartiennent à un large groupe de virus dont l'entrée infectieuse dépend de la maturation
284 endosomale tardive, dits L-PV (de l'anglais 'Late-penetrating virus') [42]. Plusieurs phlébovirus
285 pénètrent le cytosol entre 20 et 60 minutes après le début de leur internalisation dans la cellule [36-
286 38], un laps de temps compatible avec celui de la maturation des endosomes tardifs (**Figure 2**)
287 [42].

288 Les vésicules endosomales tardives sont connues pour se déplacer le long des microtubules
289 depuis la périphérie de la cellule vers le noyau, un processus étroitement lié à leur maturation. La

290 perturbation du réseau des microtubules par des molécules chimiques, comme le nocodazole et la
291 colcémide, conduit à bloquer l'infection productive par le VUUK et le VFST [36, 37], signe que
292 ces virus requièrent un réseau de microtubules intact pour infecter la cellule. Un autre élément
293 supportant l'appartenance des phlébovirus et des banyangvirus au groupe des L-PV est que la
294 fusion de leur enveloppe membranaire avec celle des endosomes est activée par l'acidité
295 endosomale, pour des valeurs de pH inférieures à 5.7 [36-38, 43]. Cette acidité est typique des
296 vésicules endosomales tardives [42].

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

313 **Fusion et pénétration des phlébovirus dans le cytosol**

314 Les virus entrant dans la cellule par endocytose doivent, en définitive, traverser la membrane des
315 endosomes pour libérer leur génome et leurs protéines accessoires dans le cytosol. Les phlébovirus
316 y parviennent par un mécanisme de fusion membranaire médié par la protéine G_C [26].
317 L'acidification s'avère suffisante pour déclencher la fusion du VFVR et du VUUK dans des
318 approches *in vitro* sans cellule [38, 45]. D'ailleurs, l'exposition du VFVR à des tampons acides, en
319 absence de toute membrane cible, conduit à d'importantes modifications des propriétés

320 biochimiques de la glycoprotéine G_C [38]. L'acidité endosomale sert de signal majeur au
321 déclenchement de la fusion de nombreux virus enveloppés mais, seule, est parfois insuffisante.
322 Entre autres, des récepteurs intracellulaires, des lipides spécifiques dans les membranes
323 endosomales cibles, ou encore un clivage protéolytique des protéines d'enveloppe virale sont
324 parfois nécessaires [41]. Ainsi, en plus de l'acidification, la pénétration du VFST semble dépendre
325 du clivage endosomal de ses glycoprotéines G_N et G_C par des protéases de la famille des cathepsines
326 [23]. Aussi, le bis(monoacylglycérol)phosphate, un lipide constitutif de certaines populations
327 d'endosomes tardifs, facilite la fusion du VUUK avec des liposomes [45].

328 La fusion des membranes virale et endosomale est un mécanisme étroitement coordonné dans
329 le temps et l'espace [46]. Typiquement, durant ce processus, les protéines virales de fusion
330 subissent de multiples changements conformationnels. Elles ciblent et harponnent la bicouche
331 lipidique de l'endosome *via* leur sous-unité de fusion. Progressivement, elles tirent les membranes
332 de l'endosome et du virion l'une vers l'autre, par étapes successives d'apposition étroite,
333 d'hémifusion, et de fusion [41, 46, 47]. Il en résulte l'ouverture de pores dans la membrane
334 endosomale par lesquels le matériel viral est libéré dans le cytosol. La cellule est alors infectée et
335 la réplication virale peut débiter.

336 Il existe au moins trois classes distinctes de protéines virales capables de médier la fusion
337 membranaire (classes I à III), chacune avec des spécificités mécanistiques et structurales propres
338 [46]. Des progrès importants ont été réalisés ces dernières années dans la caractérisation structurale
339 de la glycoprotéine de fusion G_C des phlébovirus. La structure cristallographique de l'ectodomaine
340 de la protéine G_C du VFVR a été obtenue récemment dans ses deux états, pré- et post-fusion, avec
341 une résolution inférieure à 2,0 Å [48, 49]. La structure de la forme post-fusion de G_C a également
342 été déterminée pour les banyangvirus VFST et VHRT [50, 51]. L'ensemble de ces données indique
343 que la glycoprotéine virale G_C des phlébovirus et des banyangvirus adopte une conformation très
344 similaire à celle des protéines de fusion membranaire de classe II [11].

345 Dernièrement, l'ectodomaine de la glycoprotéine G_N du VFVR et du VFST a été cristallisé et
346 analysé par rayons X [26, 52], posant un regard neuf sur l'organisation structurale globale des
347 particules phlébovirales et banyangvirales ainsi que sur leur probable mécanisme de fusion. Il a
348 ainsi été possible d'apposer les structures cristallines de G_N et G_C du VFVR sur des reconstructions
349 tomographiques de particules virales au début et à la fin de la fusion membranaire [26]. A l'aide
350 de simulations informatiques pour prédire le passage d'une structure à l'autre, un modèle de fusion

351 a été proposé. Lorsque le virus est dans un milieu à pH neutre, G_N protège le peptide de fusion
352 hydrophobe de la glycoprotéine G_C. G_N aurait ainsi un rôle protecteur, empêchant une fusion
353 prématurée des virions lors du passage dans l'appareil de Golgi et la sortie cellulaire. Une fois les
354 particules virales dans le lumen endosomal, à proximité d'une membrane cible et à un pH inférieur
355 à 5.7, G_N se réoriente vers les côtés. G_C est alors libérée et s'étend vers le feuillet extérieur de la
356 membrane endosomale cible pour y insérer son peptide de fusion. Ce modèle est finalement très
357 semblable à celui proposé pour la fusion des flavivirus, des virus enveloppés de classe II non
358 apparentés aux phlébovirus [46]. De façon intéressante, il a été rapporté récemment que des
359 anticorps neutralisants l'infection par le VFVR bloquent le réarrangement fusogenic du réseau G_N-
360 G_C en ciblant le domaine distal de G_N [53].

361 L'ectodomaine des protéines de fusion de classe II comporte trois sous-domaines (I à III) et est
362 relié à une queue cytosolique transmembranaire par une courte tige [47]. Des peptides analogues
363 du domaine III et de la tige ont été utilisés avec succès pour bloquer l'infection par des flavivirus
364 mais aussi par d'autres virus de classe II, comme les alphavirus [54, 55]. Il a été démontré que de
365 tels peptides interfèrent avec des interactions intramoléculaires dans les protéines virales de fusion,
366 lors des réarrangements conformationnels menant à la fusion membranaire. La présence de ces
367 peptides maintient sans doute la protéine de fusion dans une conformation intermédiaire, précédant
368 l'étape de post-fusion, et empêche ainsi la fusion membranaire et l'infection virale. Des stratégies
369 similaires ont été employées avec certains phlébovirus et ont donné des résultats identiques. Ainsi,
370 des peptides dirigés contre la tige de la glycoprotéine G_C bloquent l'infection par le VFVR [56].

371 Des histidines dans les protéines de fusion, y compris dans celles de classe II d'origine virale,
372 servent de capteur d'acidification dans le lumen endosomal. Ces résidus définissent souvent le pH
373 optimal de la fusion virale [57]. L'environnement local de ces histidines influe sur leur pK_a, avec
374 des valeurs aussi large que 4,5 – 7,3, et *in fine*, sur le pH optimal pour la fusion des particules
375 virales [58]. De tels résidus histidines ont été identifiés dans la glycoprotéine G_C du VFVR par
376 analyse mutationnelle [38]. Le pH optimal de pénétration a été déterminé pour plusieurs
377 phlébovirus et banyangvirus par des approches consistant à mesurer la fusion entre virus et
378 liposomes, virus et cellules, ou encore, entre cellules lorsqu'elles expriment les glycoprotéines G_N
379 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
380 pour le VFST et 5,7 pour le VFVR [36-38, 45]. En fin de compte, le principal facteur de l'activation
381 de la fusion de la plupart des phlébovirus semble être le pH endosomal.

382 **Conclusion et perspectives**

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

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

402 La caractérisation des particules virales, transmises par les arthropodes aux mammifères, est
403 aussi un objectif important. La biologie cellulaire chez les arthropodes diffère significativement de
404 celle des mammifères. La composition en lipides de l'enveloppe virale, ainsi que la nature des
405 oligosaccharides dans les glycoprotéines à la surface des virions, sont des facteurs à même
406 d'influencer les interactions avec les récepteurs, les mécanismes d'endocytose, et la fusion
407 membranaire. Par exemple, il a été montré que la glycosylation et la conformation de la
408 glycoprotéine G_N du VUUK diffèrent grandement selon que le virus est produit en cellules de tique
409 ou de mammifère [61]. De plus, le virus dérivant de cellules de tique présente une plus grande
410 facilité à infecter des cellules de mammifère que son équivalent amplifié en cellules de mammifère
411 [61]. Trop souvent les études portant sur les phlébovirus impliquent des stocks de virus issus de

412 cellules de mammifère, moins pertinents pour étudier la transmission virale et les étapes précoces
413 de l'infection.

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

426 **Remerciements**

427 Ce travail a été soutenu par des fonds CellNetworks Research Group ainsi que des financements
428 de la DFG (LO-2338/1-1 et LO-2338/3-1) attribués à Pierre-Yves Lozach.

429 **Références**

- 430 1. Maes P, Adkins S, Alkhovsky SV, Avsic-Zupanc T, Ballinger MJ, Bente DA *et al.*
431 Taxonomy of the order Bunyavirales: second update 2018. Archives of virology2019
432 Mar;164(3):927-41.
- 433 2. 10th Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV). 2017.
- 434 3. Leger P, Lozach PY. Bunyaviruses: from transmission by arthropods to virus entry into the
435 mammalian host first-target cells. Future Virol2015;10(7):859-81.
- 436 4. Workshop on Prioritization of Pathogens. Blueprint for R&D preparedness and response to
437 public health emergencies due to highly infectious pathogens. World Health
438 OrganizationDec 8-9. 2015.
- 439 5. Linthicum KJ, Britch SC, Anyamba A. Rift Valley Fever: An Emerging Mosquito-Borne
440 Disease. Annu Rev Entomol2016;61:395-415.

- 441 6. Moriconi M, Rugna G, Calzolari M, Bellini R, Albieri A, Angelini P *et al.* Phlebotomine
442 sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus
443 infections. *PLoS Negl Trop Dis*2017 Aug;11(8):e0005660.
- 444 7. Rezelj VV, Overby AK, Elliott RM. Generation of mutant Uukuniemi viruses lacking the
445 nonstructural protein NSs by reverse genetics indicates that NSs is a weak interferon
446 antagonist. *J Virol*2015 May;89(9):4849-56.
- 447 8. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YL *et al.* Fever with thrombocytopenia
448 associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med.* [Research Support, N.I.H.,
449 Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Apr 21;364(16):1523-32.
- 450 9. McMullan LK, Folk SM, Kelly AJ, MacNeil A, Goldsmith CS, Metcalfe MG *et al.* A new
451 phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *N Engl J Med.* [Case Reports].
452 2012 Aug 30;367(9):834-41.
- 453 10. Elliott RM, Brennan B. Emerging phleboviruses. *Current opinion in virology*2014 Apr;5:50-
454 7.
- 455 11. Guardado-Calvo P, Rey FA. The Envelope Proteins of the Bunyavirales. *Adv Virus*
456 *Res*2017;98:83-118.
- 457 12. Spiegel M, Plegge T, Pohlmann S. The Role of Phlebovirus Glycoproteins in Viral Entry,
458 Assembly and Release. *Viruses*2016 Jul 21;8(7).
- 459 13. Hornak KE, Lanchy JM, Lodmell JS. RNA Encapsidation and Packaging in the
460 Phleboviruses. *Viruses*2016 Jul 15;8(7).
- 461 14. Eifan S, Schnettler E, Dietrich I, Kohl A, Blomstrom AL. Non-structural proteins of
462 arthropod-borne bunyaviruses: roles and functions. *Viruses*2013 Oct;5(10):2447-68.
- 463 15. Overby AK, Pettersson RF, Grunewald K, Huiskonen JT. Insights into bunyavirus
464 architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus. *Proceedings of the National*
465 *Academy of Sciences of the United States of America*2008 Feb 19;105(7):2375-9.
- 466 16. Freiberg AN, Sherman MB, Morais MC, Holbrook MR, Watowich SJ. Three-dimensional
467 organization of Rift Valley fever virus revealed by cryoelectron tomography. *J Virol*2008
468 Nov;82(21):10341-8.
- 469 17. Huiskonen JT, Overby AK, Weber F, Grunewald K. Electron cryo-microscopy and single-
470 particle averaging of Rift Valley fever virus: evidence for GN-GC glycoprotein heterodimers.
471 *J Virol*2009 Apr;83(8):3762-9.

- 472 18. Boulant S, Stanifer M, Lozach PY. Dynamics of virus-receptor interactions in virus binding,
473 signaling, and endocytosis. *Viruses*2015 Jun;7(6):2794-815.
- 474 19. de Boer SM, Kortekaas J, de Haan CA, Rottier PJ, Moormann RJ, Bosch BJ. Heparan sulfate
475 facilitates Rift Valley fever virus entry into the cell. *J Virol*. [Research Support, Non-U.S.
476 Gov't]. 2012 Dec;86(24):13767-71.
- 477 20. Pietrantoni A, Fortuna C, Remoli ME, Ciufolini MG, Superti F. Bovine lactoferrin inhibits
478 Toscana virus infection by binding to heparan sulphate. *Viruses*2015 Feb;7(2):480-95.
- 479 21. Riblett AM, Blomen VA, Jae LT, Altamura LA, Doms RW, Brummelkamp TR *et al*. A
480 Haploid Genetic Screen Identifies Heparan Sulfate Proteoglycans Supporting Rift Valley
481 Fever Virus Infection. *J Virol*2016 Feb 1;90(3):1414-23.
- 482 22. Lozach PY, Kuhbacher A, Meier R, Mancini R, Bitto D, Bouloy M *et al*. DC-SIGN as a
483 receptor for phleboviruses. *Cell host & microbe*2011 Jul 21;10(1):75-88.
- 484 23. Hofmann H, Li X, Zhang X, Liu W, Kuhl A, Kaup F *et al*. Severe fever with
485 thrombocytopenia virus glycoproteins are targeted by neutralizing antibodies and can use
486 DC-SIGN as a receptor for pH-dependent entry into human and animal cell lines. *J Virol*2013
487 Apr;87(8):4384-94.
- 488 24. Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S *et al*.
489 Characterization of Glycoprotein-Mediated Entry of Severe Fever with Thrombocytopenia
490 Syndrome Virus. *J Virol*2016 Jun 1;90(11):5292-301.
- 491 25. Svajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion,
492 signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell*
493 *Signal*2010 Oct;22(10):1397-405.
- 494 26. Halldorsson S, Li S, Li M, Harlos K, Bowden TA, Huiskonen JT. Shielding and activation
495 of a viral membrane fusion protein. *Nat Commun*2018 Jan 24;9(1):349.
- 496 27. Phoenix I, Nishiyama S, Lokugamage N, Hill TE, Huante MB, Slack OA *et al*. N-Glycans
497 on the Rift Valley Fever Virus Envelope Glycoproteins Gn and Gc Redundantly Support
498 Viral Infection via DC-SIGN. *Viruses*2016;8(5).
- 499 28. Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, Xiao C *et al*. Cryo-EM
500 reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-
501 SIGN. *Cell*2006 Feb 10;124(3):485-93.

- 502 29. Pustynnikov S, Sagar D, Jain P, Khan ZK. Targeting the C-type lectins-mediated host-
503 pathogen interactions with dextran. *J Pharm Pharm Sci*2014;17(3):371-92.
- 504 30. Leger P, Tetard M, Youness B, Cordes N, Rouxel RN, Flamand M *et al.* Differential Use of
505 the C-Type Lectins L-SIGN and DC-SIGN for Phlebovirus Endocytosis. *Traffic*2016
506 Jun;17(6):639-56.
- 507 31. Sun Y, Qi Y, Liu C, Gao W, Chen P, Fu L *et al.* Nonmuscle myosin heavy chain IIA is a
508 critical factor contributing to the efficiency of early infection of severe fever with
509 thrombocytopenia syndrome virus. *J Virol*2014 Jan;88(1):237-48.
- 510 32. Silvas JA, Popov VL, Paulucci-Holthauzen A, Aguilar PV. Extracellular Vesicles Mediate
511 Receptor-Independent Transmission of Novel Tick-Borne Bunyavirus. *J Virol*2016 Jan
512 15;90(2):873-86.
- 513 33. Hoffmann AB, Mazelier M, Leger P, Lozach PY. Deciphering Virus Entry with
514 Fluorescently Labeled Viral Particles. *Methods Mol Biol*2018;1836:159-83.
- 515 34. Drake MJ, Brennan B, Briley K, Jr., Bart SM, Sherman E, Szemiel AM *et al.* A role for
516 glycolipid biosynthesis in severe fever with thrombocytopenia syndrome virus entry. *PLoS*
517 *pathogens*2017 Apr;13(4):e1006316.
- 518 35. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL *et al.*
519 Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-
520 mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization
521 signals. *J Biol Chem*2005 Jun 24;280(25):23698-708.
- 522 36. Liu J, Xu M, Tang B, Hu L, Deng F, Wang H *et al.* Single-Particle Tracking Reveals the
523 Sequential Entry Process of the Bunyavirus Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome
524 Virus. *Small*2018 Dec 27:e1803788.
- 525 37. Lozach PY, Mancini R, Bitto D, Meier R, Oestereich L, Overby AK *et al.* Entry of
526 bunyaviruses into mammalian cells. *Cell host & microbe*2010 Jun 25;7(6):488-99.
- 527 38. de Boer SM, Kortekaas J, Spel L, Rottier PJ, Moormann RJ, Bosch BJ. Acid-activated
528 structural reorganization of the Rift Valley fever virus Gc fusion protein. *J Virol.* [Research
529 Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Dec;86(24):13642-52.
- 530 39. Harmon B, Schudel BR, Maar D, Kozina C, Ikegami T, Tseng CT *et al.* Rift Valley fever
531 virus strain MP-12 enters mammalian host cells via caveola-mediated endocytosis. *J*
532 *Virol*2012 Dec;86(23):12954-70.

- 533 40. Filone CM, Hanna SL, Caino MC, Bambina S, Doms RW, Cherry S. Rift valley fever virus
534 infection of human cells and insect hosts is promoted by protein kinase C epsilon. PLoS One.
535 [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2010;5(11):e15483.
- 536 41. White JM, Whittaker GR. Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes. Traffic2016
537 Jun;17(6):593-614.
- 538 42. Lozach PY, Huotari J, Helenius A. Late-penetrating viruses. Current opinion in virology2011
539 Jul;1(1):35-43.
- 540 43. Liu L, Celma CC, Roy P. Rift Valley fever virus structural proteins: expression,
541 characterization and assembly of recombinant proteins. Virol J2008;5:82.
- 542 44. Wang T, Ming Z, Xiaochun W, Hong W. Rab7: role of its protein interaction cascades in
543 endo-lysosomal traffic. Cell Signal2011 Mar;23(3):516-21.
- 544 45. Bitto D, Halldorsson S, Caputo A, Huiskonen JT. Low pH and Anionic Lipid-dependent
545 Fusion of Uukuniemi Phlebovirus to Liposomes. J Biol Chem2016 Mar 18;291(12):6412-22.
- 546 46. Harrison SC. Viral membrane fusion. Virology2015 May;479-480:498-507.
- 547 47. Kielian M. Mechanisms of Virus Membrane Fusion Proteins. Annu Rev Virol2014
548 Nov;1(1):171-89.
- 549 48. Dessau M, Modis Y. Crystal structure of glycoprotein C from Rift Valley fever virus.
550 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America2013 Jan
551 29;110(5):1696-701.
- 552 49. Guardado-Calvo P, Atkovska K, Jeffers SA, Grau N, Backovic M, Perez-Vargas J *et al.* A
553 glycerophospholipid-specific pocket in the RVFV class II fusion protein drives target
554 membrane insertion. Science2017 Nov 3;358(6363):663-67.
- 555 50. Halldorsson S, Behrens AJ, Harlos K, Huiskonen JT, Elliott RM, Crispin M *et al.* Structure
556 of a phleboviral envelope glycoprotein reveals a consolidated model of membrane fusion.
557 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America2016 Jun
558 28;113(26):7154-9.
- 559 51. Zhu Y, Wu Y, Chai Y, Qi J, Peng R, Feng WH *et al.* The Postfusion Structure of the
560 Heartland Virus Gc Glycoprotein Supports Taxonomic Separation of the Bunyaviral Families
561 Phenuiviridae and Hantaviridae. J Virol2018 Jan 1;92(1).
- 562 52. Wu Y, Zhu Y, Gao F, Jiao Y, Oladejo BO, Chai Y *et al.* Structures of phlebovirus
563 glycoprotein Gn and identification of a neutralizing antibody epitope. Proceedings of the

564 National Academy of Sciences of the United States of America 2017 Sep 5;114(36):E7564-
565 E73.

566 53. Allen ER, Krumm SA, Raghwani J, Halldorsson S, Elliott A, Graham VA *et al.* A Protective
567 Monoclonal Antibody Targets a Site of Vulnerability on the Surface of Rift Valley Fever
568 Virus. *Cell Rep* 2018 Dec 26;25(13):3750-58 e4.

569 54. Liao M, Kielian M. Domain III from class II fusion proteins functions as a dominant-negative
570 inhibitor of virus membrane fusion. *The Journal of cell biology* 2005 Oct 10;171(1):111-20.

571 55. Schmidt AG, Yang PL, Harrison SC. Peptide inhibitors of dengue-virus entry target a late-
572 stage fusion intermediate. *PLoS pathogens* 2010 Apr 8;6(4):e1000851.

573 56. Koehler JW, Smith JM, Ripoll DR, Spik KW, Taylor SL, Badger CV *et al.* A fusion-
574 inhibiting peptide against Rift Valley fever virus inhibits multiple, diverse viruses. *PLoS*
575 *Negl Trop Dis* 2013;7(9):e2430.

576 57. Kampmann T, Mueller DS, Mark AE, Young PR, Kobe B. The Role of histidine residues in
577 low-pH-mediated viral membrane fusion. *Structure* 2006 Oct;14(10):1481-7.

578 58. Edgcomb SP, Murphy KP. Variability in the pKa of histidine side-chains correlates with
579 burial within proteins. *Proteins* 2002 Oct 1;49(1):1-6.

580 59. Meier R, Franceschini A, Horvath P, Tetard M, Mancini R, von Mering C *et al.* Genome-
581 wide small interfering RNA screens reveal VAMP3 as a novel host factor required for
582 Uukuniemi virus late penetration. *J Virol* 2014 Aug;88(15):8565-78.

583 60. Hopkins KC, McLane LM, Maqbool T, Panda D, Gordesky-Gold B, Cherry S. A genome-
584 wide RNAi screen reveals that mRNA decapping restricts bunyaviral replication by limiting
585 the pools of Dcp2-accessible targets for cap-snatching. *Genes Dev* 2013 Jul 1;27(13):1511-
586 25.

587 61. Mazelier M, Rouxel RN, Zumstein M, Mancini R, Bell-Sakyi L, Lozach PY. Uukuniemi
588 Virus as a Tick-Borne Virus Model. *J Virol* 2016 Aug 1;90(15):6784-98.

589 62. Hackett BA, Yasunaga A, Panda D, Tartell MA, Hopkins KC, Hensley SE *et al.* RNASEK
590 is required for internalization of diverse acid-dependent viruses. *Proceedings of the National*
591 *Academy of Sciences of the United States of America* 2015 Jun 23;112(25):7797-802.

592 63. Yamauchi Y, Boukari H, Banerjee I, Sbalzarini IF, Horvath P, Helenius A. Histone
593 deacetylase 8 is required for centrosome cohesion and influenza A virus entry. *PLoS*
594 *pathogens* 2011 Oct;7(10):e1002316.

595 **Légendes**

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

610 **Figure 2.** Internalisation et trafic intracellulaire des phlébovirus. L'entrée infectieuse des
611 phlébovirus dans les cellules de mammifère implique diverses voies pinocytaires et dépend de la
612 maturation endosomale, qui, elle-même requiert des centaines de facteurs cellulaires. Les chemins
613 d'entrée des phlébovirus les mieux caractérisés apparaissent en bleu. Celui du banyangvirus VFST
614 apparaît en vert. Sur la droite, les échelles indiquent le temps mis par un cargo pour aller de la
615 membrane plasmique à un compartiment endosomal (Δt) et l'acidité endosomale correspondante
616 (pH). **Abréviations :** EEA1, antigène endosome précoce 1 ; Lamp1, protéine membranaire associée
617 aux lysosomes 1 ; Rab5 et Rab7, petites GTPases Rab 5 et 7 ; VFST, virus à fièvre sévère avec
618 thrombocytopenie ; VFVR, virus de la fièvre de la Vallée du Rift ; VIL, vésicule intraluminale ;
619 VUUK, virus d'Uukuniemi.

620 **Tableaux**621 **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

622

623 **Tableau 2.** Récepteurs potentiels connus pour les phlébovirus et les banyangvirus chez l'hôte
 624 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]

625 **Abréviations :** NMMHCIIA, chaîne lourde de myosine non musculaire de type IIA ; ppVFST,
 626 rhabdovirus pseudotypé avec les glycoprotéines G_N et G_C du virus à fièvre sévère avec
 627 thrombocytopénie ; VFST, virus à fièvre sévère avec thrombocytopénie ; VFVR, virus de la
 628 fièvre de la Vallée du Rift ; VPT, virus Punta Toro ; VTOS, virus de Toscana ; VUUK, virus
 629 d'Uukuniemi.

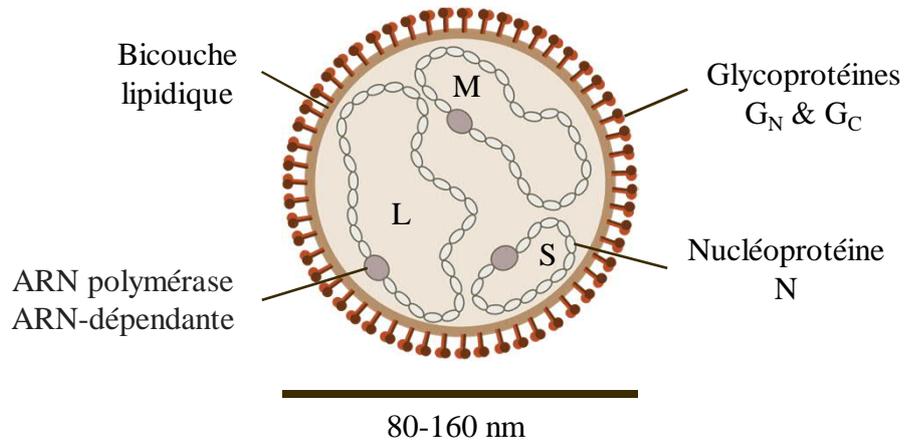
630 **Tableau 3.** Facteurs et processus cellulaires impliqués dans l'entrée infectieuse des phlébovirus et
 631 des banyangvirus.

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]

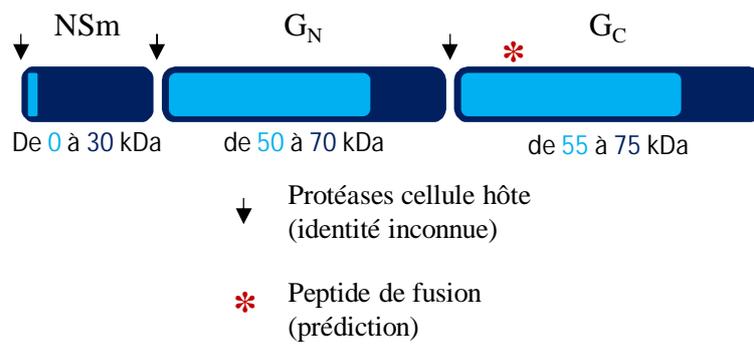
632 Les facteurs cellulaires en rouge ont été décrits par des études indépendantes comme étant soit
 633 requis soit inutiles dans l'entrée cellulaire du virus.

634 **Abréviations :** BMP, bis(monoacylglycérol)phosphate ; HDAC8, histone désacétylase 8 ; Lamp1,
 635 protéine membranaire associée aux lysosomes 1 ; PAK1, Kinase1 activée par la p21 ; PI3K,
 636 phosphoinositide 3-kinase ; PLC, phospholipase C ; PKC, protéine kinase C ; PP1/PP2A, protéine
 637 phosphatase 1/ 2A ; Rab5 et 7, petites GTPases Rab 5 et 7 ; RNASEK, ribonucléase K ; VAMP3,
 638 protéine membranaire associée aux vésicules 3 ; vATPase, adénosine triphosphatase vacuolaire ;
 639 VFST, virus à fièvre sévère avec thrombocytopenie ; VFVR, virus de la fièvre de la Vallée du Rift ;
 640 VHRT, virus heartland ; VUUK, virus d'Uukuniemi.

A.



B.



C.

Symétrie icosaédrique
T = 12

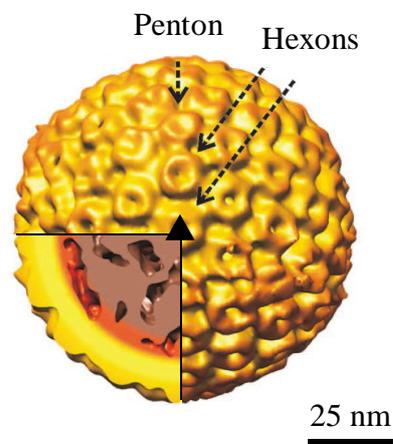


Figure 1

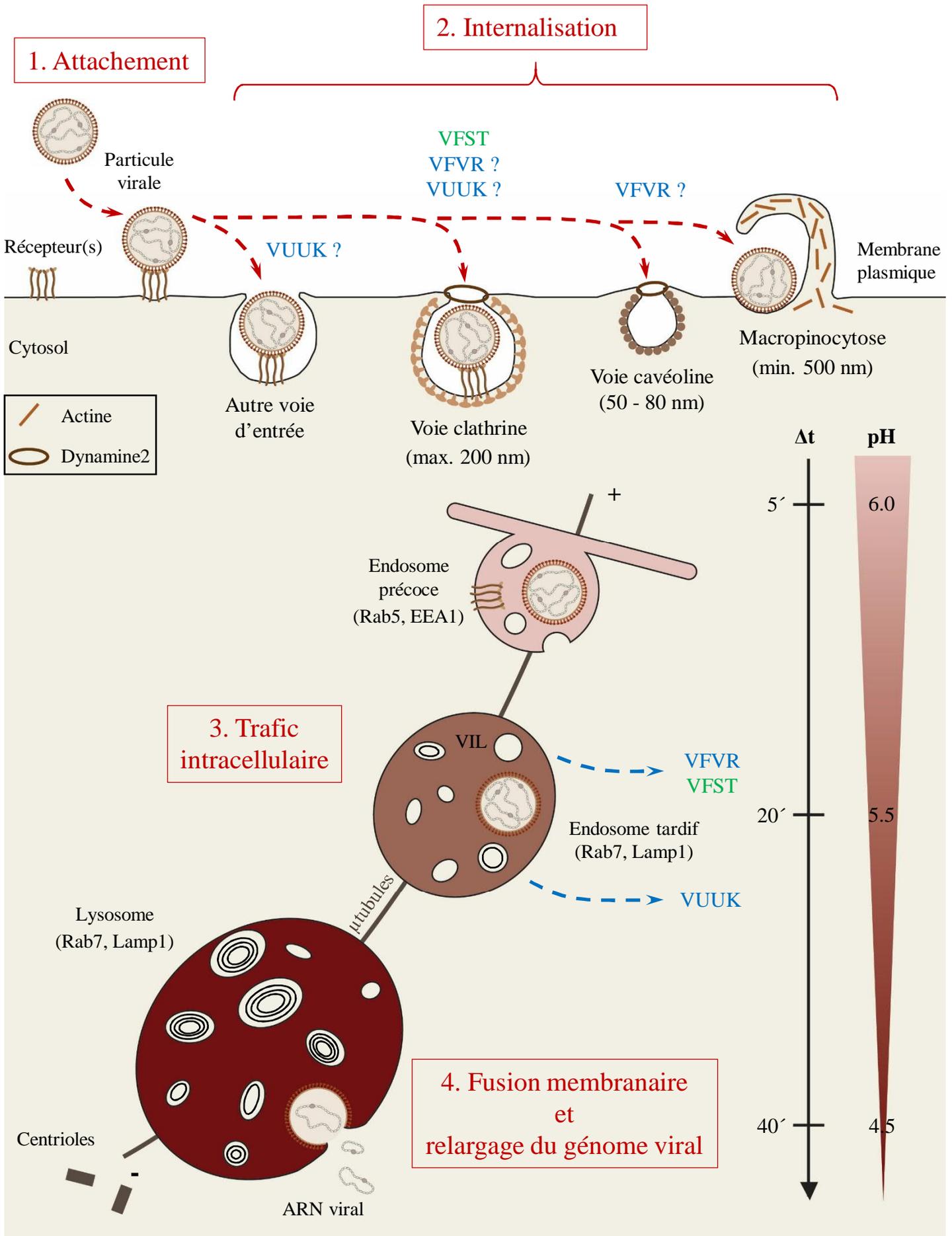


Figure 2