

Les vaccins contre la Covid-19

P. BERCHE*

RÉSUMÉ

Les vaccins contre le virus SARS-CoV-2 apparaissent comme un véritable espoir pour sortir de la crise sanitaire et sociale déclenchée par la Covid-19. On ne peut qu'être impressionné par la performance scientifique qui a accompagné l'émergence de cette pandémie meurtrière. En quelques semaines, le nouveau virus a été identifié et séquencé. En douze mois à peine après cette découverte, non moins de neuf vaccins ont été testés dans des essais cliniques de phase III, avec des résultats très encourageants. Plusieurs vaccins sont en cours d'homologation pour un usage large. Les stratégies de vaccination ont suivi des méthodologies classiques utilisant des virus entiers inactivés ou vivants atténués, ou des protéines purifiées administrées avec des adjuvants. On a aussi testé avec succès des méthodologies innovantes, tels que des vecteurs viraux hétérologues portant le gène codant la protéine Spike, le facteur majeur de virulence du coronavirus. D'autres essais ont recouru à des vaccins porteurs de séquences nucléotidiques du gène *spike* du virus, l'ADN ou l'ARN, une méthodologie très peu appliquée jusqu'ici chez l'homme. Les plus avancés sont les vaccins ARNm qui ont bénéficié de dix ans de recherche dans le domaine des nanoparticules lipidiques et de la synthèse de l'ARNm. L'ARNm du gène *spike* (ou le segment du gène codant le domaine récepteur de la protéine) est synthétisé et sa séquence est optimisée pour faciliter sa lecture en protéines. Pour le protéger, on l'incorpore dans des nanoparticules lipidiques. Accédant directement aux cellules dendritiques et aux macrophages tissulaires, il est traduit par ces phagocytes en protéine virale qui, après apprêtement, est présentée aux lymphocytes. Les résultats des essais de phase III montrent une remarquable efficacité de ces vaccins ARNm qui confèrent une protection de 95 % et une bonne tolérance malgré des effets secondaires fréquents, mais mineurs. En dépit des incertitudes qui demeurent, notamment concernant la durée de la protection et l'éventuelle contagiosité des vaccinés, les vaccins ARNm pourraient infléchir l'évolution de la pandémie en protégeant les sujets les plus vulnérables et en diminuant la circulation du virus. Faciles à préparer, ils pourraient marquer une nouvelle ère dans l'histoire de la vaccinologie, avec des applications potentielles dans de nombreuses pathologies non infectieuses, comme le cancer.

MOTS-CLÉS : SARS-Cov-2, Covid-19, coronavirus, vaccin inactivé, vaccin vivant atténué, virus hétérologue recombinant, protéine Spike, ARNmessenger.

I. - INTRODUCTION

Nul ne s'attendait à voir émerger une pandémie d'infections respiratoires contraignant au confinement des deux tiers de la population mondiale. La maladie nommée Covid-19 est une pneumopathie parfois très sévère, atteignant préférentiellement les personnes âgées ou atteintes de comorbidité (diabète, obésité, hypertension artérielle, etc.). Épargnant mystérieusement les jeunes enfants, contrairement à la grippe, elle est responsable de près de 90 %

des décès chez les sujets de plus de 65 ans. Le nouveau virus désigné SARS-CoV-2 aurait émergé en octobre-novembre 2019 à Wuhan en Chine et, depuis décembre 2019, dans plusieurs pays occidentaux, de façon insidieuse et méconnue. Il a été identifié dès le mois de janvier 2020. Provenant de chauve-souris, ce coronavirus s'est adapté à l'homme en passant par

* Membre de la cellule Covid-19 de l'Académie nationale de médecine. Manuscrit reçu le 30 décembre 2020.

des hôtes intermédiaires inconnus, même si le rôle du pangolin a été envisagé. Il s'agit d'un β -coronavirus apparenté au SARS-CoV-1 responsable de l'épidémie de SARS de 2002. Depuis des décennies, il existe quatre coronavirus humains responsables d'épidémies bénignes de rhinites : deux α -coronavirus (NL63 et 229E) et deux β -coronavirus (HKUI et OC43). Certains pensent que le virus OC43 serait le reliquat lointain d'un virus très virulent. D'après des études phylogéniques, ce virus est très proche du coronavirus bovin BCoV dont il s'est séparé en 1890. Il pourrait avoir été l'agent étiologique de la pandémie de grippe de 1890, appelée « grippe russe » (1, 2).

Depuis plus d'un an, le SARS-CoV-2 circule dans la population mondiale, par vagues successives. Son infectiosité est proche de celle de la grippe saisonnière, c'est-à-dire qu'un patient contamine en moyenne trois personnes (c'est ce qu'on appelle le « R0 »). En France, la première vague, survenue en février-mars 2020, a contraint les autorités gouvernementales à décréter un confinement strict de la population, du 17 mars au 11 mai 2020, pour éviter l'effondrement du système de santé. Suite à un relâchement des mesures barrières, une seconde vague est apparue en septembre 2020, en France et dans les pays occidentaux, d'une surprenante vigueur tout à fait inattendue, perturbant considérablement l'activité de notre pays et entraînant, fin décembre 2020, plus de 2,4 millions de contaminations détectées depuis le printemps et près de 60 000 décès déclarés. Dans le monde, on dénombre, fin décembre 2020, 76 millions de cas confirmés et 1,7 million de décès, dont en Europe 21 millions de cas et 487 245 décès.

Comment sortir de cette crise sanitaire sans précédent depuis la grippe espagnole ? La seule façon d'arrêter la circulation du virus est de parvenir à ce qu'on appelle l'immunité collective (3), c'est-à-dire une protection contre la contagion d'une proportion supérieure à 60 % de la population. Cela peut prendre des années, avec un coût humain très important. Le but de la vaccination est précisément d'atteindre beaucoup plus vite cette immunité collective et de protéger les personnes vulnérables contre les infections sévères.

II. - L'IMMUNITÉ CONTRE LA COVID-19

En quelques mois, la recherche scientifique a permis d'éclaircir la physiopathologie de l'infection par le SARS-CoV-2. Inhalé, le coronavirus se multiplie dans l'épithélium des voies aériennes supérieures en s'attachant, par ses spicules formées de protéine Spike, au récepteur cellulaire ACE-2 (*Angiotensin-Converting Enzyme 2*), une enzyme transmembranaire exposée à la surface des cellules épithéliales respiratoires, des cellules endothéliales et des pneumocytes de type II des alvéoles pulmonaires (Figure 1). Cette

infection induit une forte réponse immunitaire, humorale (anticorps IgG, IgM, IgA) et cellulaire avec production de lymphocytes cytotoxiques qui détruisent les cellules infectées par le virus (4, 5). Dans la majorité des cas (85 %), cette réponse immunitaire élimine le virus en sept à dix jours, ce qui aboutit à la guérison avec une réponse inflammatoire modérée : l'infection est donc bénigne, sous réserve de séquelles qui peuvent prolonger de façon intermittente les symptômes de la maladie, alors que le virus a disparu (syndrome post-Covid-19). Cependant, la réponse immunitaire peut être inadaptée chez certains patients (environ 15 %), qui vont développer des formes sévères avec détresse respiratoire et parfois décès. Vers le 6^e-7^e jour, apparaît une réponse inflammatoire intense, alors que le virus viable a disparu le plus souvent, avec production massive de cytokines (« orage cytokinique ») par les cellules immunitaires infiltrant les tissus, d'où un œdème pulmonaire et des troubles thrombo-emboliques, aboutissant à une défaillance multiviscérale souvent mortelle (6). Au décours de la Covid-19, les patients acquièrent une protection contre une réinfection, attestée par la rareté des rechutes documentées avec présence de virus viables (7, 8).

Des facteurs de risque génétiques associés à la sévérité de la Covid-19 ont été mis au jour en analysant des milliers de génomes viraux provenant de patients atteints de formes graves, comparativement à ceux présentant des formes bénignes. Ainsi, un locus (dit *3p21.31*) a été identifié sur le chromosome 3, uniquement chez les patients sévèrement atteints (9, 10). Une étude récente montre que la présence d'un fragment de 50 kb dans ce locus, hérité de nos ancêtres néandertaliens, est associée à un risque trois fois plus élevé de manifester une forme sévère. Ce fragment est présent à l'état hétérozygote chez 30 % des populations de l'Asie du Sud, 8 % de celles de l'Europe et 63 % de celles du Bangladesh (dont 13 % d'homozygotes pour ce variant), mais absent chez les Africains (11). On a aussi montré récemment que 3,5 % de formes graves sont liées à un déficit génétique de la production d'interféron (12).

En définitive, la Covid-19 apparaît être une maladie immunologique déclenchée par un virus éliminé souvent rapidement, même lors des formes sévères, mais capable d'induire aussi, sur certains terrains, une réponse immunitaire inappropriée allant de « l'orage cytokinique » aux formes prolongées post-Covid-19.

III. - LA COURSE VACCINALE

Voici une pandémie qui s'est rapidement répandue dans le monde entier en l'espace de quelques semaines et qui évolue par vagues dans l'ensemble des pays du monde. Les seuls moyens de lutte actuel-

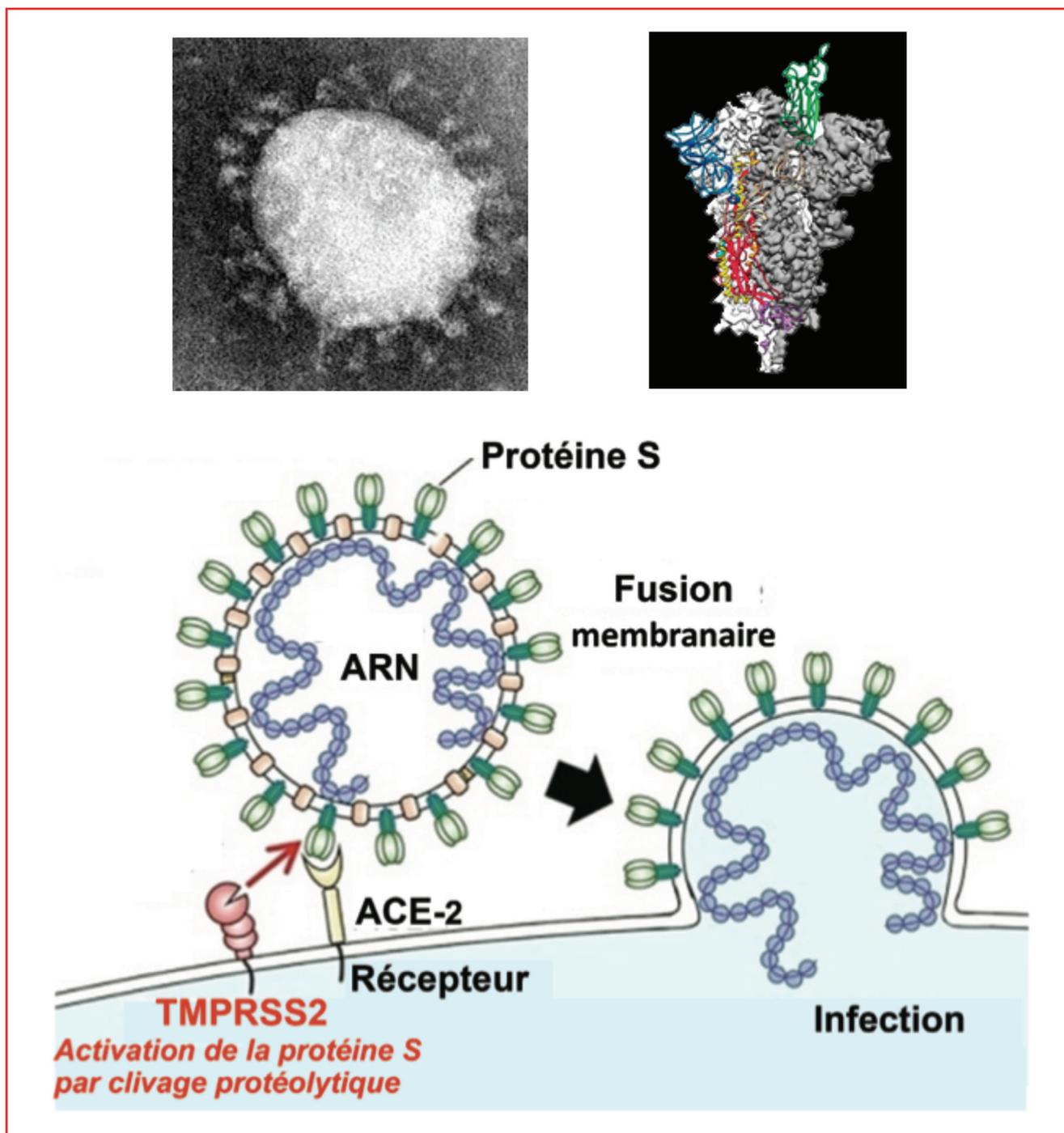


Fig. 1 - La protéine Spike (S), le facteur essentiel au SARS-CoV-2 pour initier l'infection cellulaire.

Le coronavirus est tapissé d'une couronne de spicules constitués de protéine S, dont la structure tridimensionnelle est présentée. En interagissant avec le récepteur ACE-2 exposé à la surface des cellules cibles, la protéine S permet l'entrée cellulaire du virus.

lement, en l'absence de médicaments antiviraux efficaces, sont les mesures barrières individuelles (port des masques, distanciation physique, lavage des mains) ou collectives (confinement partiel ou total, interdiction des rassemblements, fermeture des salles de spectacles, des musées, des restaurants, incitation au télétravail...). Cette crise sanitaire va de pair avec une crise économique sans précédent. L'économie mondiale est mise à bas et l'on voit s'aggraver le chômage et la précarité dans de nombreux pays du monde. Dès lors, les enjeux de la mise au point de

vaccins efficaces apparaissent majeurs. Seuls, ils peuvent aujourd'hui protéger la population contre les formes sévères de la Covid-19, mais aussi éventuellement tarir la contagiosité, ce qui mettrait fin à la pandémie, au moins pour un temps.

En conséquence, de nombreuses firmes pharmaceutiques se sont lancées dans la course aux vaccins en utilisant des technologies diverses et parfois révolutionnaires. Pas moins de 331 projets ont été entrepris et neuf vaccins sont proches de la commerciali-

sation en à peine un an après la découverte du virus. Beaucoup de vaccins en développement ont pour cible la protéine S (Spike) du coronavirus SARS-CoV-2, un facteur majeur de virulence du coronavirus lui permettant de s'attacher au récepteur membranaire ACE-2 exprimé à la surface des cellules cibles (13). Ce dernier est une enzyme transmembranaire capable de cliver l'angiotensine II 1-8, peptide vasoconstricteur, en angiotensine 1-7, peptide vasodilatateur, antioxydant et anti-inflammatoire dont l'expression est stimulée par l'interféron (14, 15). C'est ainsi que le virus peut se multiplier dans les cellules de l'épithélium respiratoire (nasal, buccal, digestif...), des alvéoles (pneumocytes de type II) et des endothéliums (16, 17). Il en résulte une immunité innée qui recrute très rapidement des cellules inflammatoires (macrophages, monocytes) dans les tissus infectés, et une forte réponse immunitaire humorale et cellulaire T et B, avec la production d'anticorps neutralisants et de lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques et *Natural Killer* (4, 18). De façon concomitante, il y a une production dans les voies aériennes d'IgA sécrétoires protégeant contre une réinfection par voie aérienne, inhibant la contagiosité des personnes convalescentes.

Ainsi, au cours de l'infection naturelle, la réponse immunitaire permet l'éradication du virus dans la majorité des cas. Il en résulte une protection attestée par la grande rareté des récurrences (19). La durée de cette protection est d'au moins six mois (20). Les primates non-humains infectés par le virus développent une maladie très proche de la Covid-19 et résistent à la surinfection expérimentale (21). Ainsi, peut-on espérer raisonnablement mettre au point des vaccins efficaces qui pourront conférer une protection individuelle et éventuellement collective contre le SARS-CoV-2. Les enjeux sont énormes : d'abord sauver des vies et mettre fin à une crise sanitaire sans précédent, qui menace d'effondrement les systèmes de santé des pays ; mais aussi faire face à un désastre économique d'une ampleur exceptionnelle, génératrice de pauvreté, de chômage et d'une crise morale. Pour cela, les industriels mettent en œuvre de moyens financiers considérables pour préparer des vaccins efficaces, sans danger. Ainsi, peut-on espérer atteindre un niveau d'immunité collective suffisant dans les populations exposées au virus. C'est dire que le facteur temps est essentiel : il faut un vaccin très vite. Comment y parvenir ?

Aujourd'hui, certains vaccins ont obtenu l'autorisation conditionnelle de mise sur le marché fin 2020. Comment cela a-t-il été possible ? Il faut habituellement cinq à dix ans pour préparer un nouveau vaccin efficace et inoffensif. Les principales étapes sont le stade préclinique qui dure deux à trois ans, pendant lequel on définit expérimentalement les cibles du vaccin, son efficacité et sa toxicité chez l'animal. Suit la phase I, au cours de laquelle le vaccin est testé sur quelques volontaires sains, notamment la production

d'anticorps neutralisants et la survenue d'effets secondaires éventuels. Puis vient la phase II réalisée chez quelques centaines de volontaires, avant la phase III « sur le terrain » comparant lors d'un essai en double aveugle deux groupes de 15 000 personnes exposées au virus, l'un vacciné, l'autre recevant un placebo. L'efficacité vaccinale est estimée par le nombre de patients développant une infection dans chacun des deux groupes, de même que l'existence d'effets indésirables avec un recul de deux mois par rapport à la fin de la vaccination.

Dans le cas du SARS-CoV-2, la phase préclinique a fortement bénéficié des connaissances acquises lors des graves épidémies de SARS en 2002 et de MERS en 2012 qui avaient déclenché des recherches sur de nouveaux vaccins, restées sans lendemain du fait de la disparition de ces coronavirus (22, 23). Sa parenté avec le coronavirus du SARS justifiait de définir la même cible privilégiée, la protéine Spike. Par ailleurs, les phases précliniques ont eu lieu de pair avec les phases cliniques I, II et III qui se sont chevauchées. Cette procédure a également été accélérée par la levée des obstacles administratifs permettant, après analyse des données brutes des essais cliniques de phase III, de donner une autorisation temporaire de mise sur le marché, précédant une éventuelle commercialisation. L'enjeu majeur pour la vaccination devient le facteur temps du fait de l'urgence de la pandémie. C'est la raison pour laquelle le choix de vaccins innovants utilisant des acides nucléiques a été privilégié, car non seulement ils confèrent une bonne protection, mais aussi leur production industrielle est très rapide.

IV. - LES TYPES DE VACCINS EN DÉVELOPPEMENT

Plus de 180 candidats vaccins ont été développés ces derniers mois. On peut les diviser en vaccins traditionnels suivant des méthodologies employées depuis des décennies, et les vaccins innovants utilisant l'ARN ou l'ADN (Figure 2). Tous ces vaccins ont été d'abord évalués chez des rongeurs puis des primates, pour leur immunogénicité et leur tolérance. Neuf d'entre eux ont atteint le stade de la phase III des essais cliniques, avec une prochaine homologation (24) (Tableau).

A) Les vaccins inactivés

À l'instar des vaccins contre la grippe, il existe des vaccins constitués de SARS-CoV-2 inactivé chimiquement par la β -propiolactone. La culture du coronavirus, effectuée sur des cellules Vero, nécessite des conditions de laboratoire de sécurité P3 et les rendements de culture sont limités. Ils sont habituellement administrés par injection intramusculaire et associés à un adjuvant tel que l'hydroxyde d'alumine. Trois

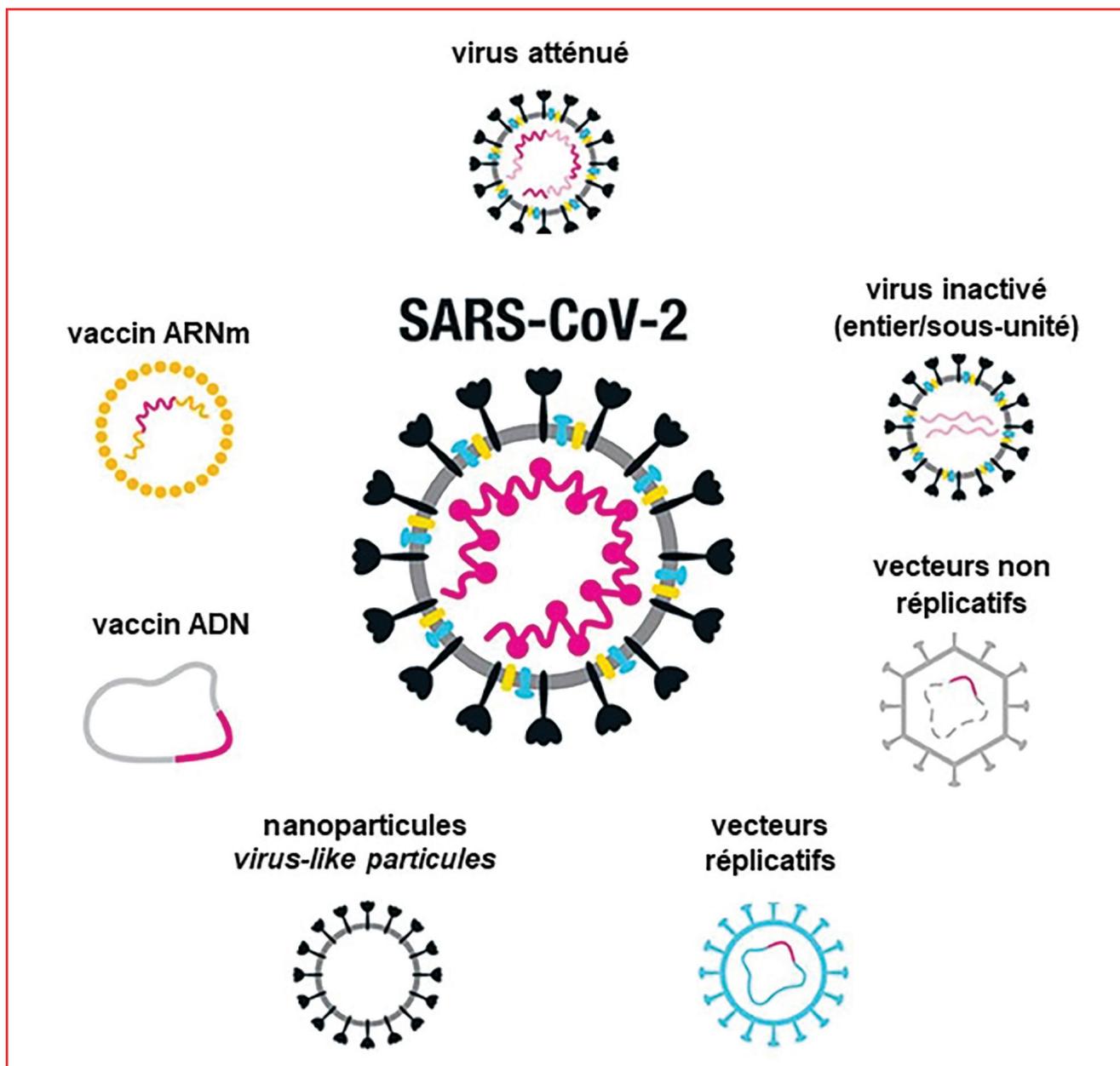


Fig. 2 - Les différents vaccins anti-Covid-19.

Tableau - Vaccins anti-Covid-19 en phase III (décembre 2020). Résultats provisoires.

Vaccins	Désignation du vaccin	Protection	Effets secondaires
Inactivés	Coronavac [Sinovac]	> 70 %	+
	BBIBP-CorV [SinoPharm]		
	Covaxin [Bahrat Biotech]		
Vecteurs viraux non répliatifs	vaccin AdV-5 [CanSino]	> 70 %	++
	vaccin Ad26 et Ad5 [Gamaleya Research Institute]		
	vaccin AdV26 [Janssen/Johnson & Johnson]		
	vaccin ChAdOx1 [Oxford/AstraZeneca]		
ARNm	vaccin mRNA-1273 45 [Moderna]	> 95 %	++
	vaccin BNT162b1 [BioNTech-Pfizer]		

vaccins inactivés ont atteint les essais cliniques de phase III : deux vaccins chinois (25-27), le Coronavac de Sinovac Biotech Ltd et le BBIBP-CoV de SinoPharm, ainsi que le vaccin indien Covaxin de Bahrat Biotech. Ces vaccins produisent une bonne réponse en anticorps neutralisants contre l'ensemble des antigènes du SARS-CoV-2 et devraient conférer une certaine protection contre le Covid-19.

B) Les vaccins vivants atténués

Il existe aussi des vaccins vivants atténués, l'atténuation de la virulence pouvant être obtenue soit par adaptation du virus à des conditions défavorables à son développement (croissance à faible température, culture sur cellules non humaines...), soit par modification du génome viral, incluant une « dé-optimisation » des codons ou une délétion des gènes viraux qui court-circuitent la réponse immunitaire innée (28, 29). Cette étape peut prendre un certain temps. Ces vaccins peuvent être administrés par voie nasale et déclenchent une production d'IgA sécrétoires éliminant le virus des voies respiratoires supérieures lors d'une réinfection : ainsi, la circulation du virus peut-elle être stoppée. Ils ne nécessitent qu'une seule dose vaccinale et induisent une réponse immunitaire polyvalente contre l'ensemble des antigènes viraux, proche de celle survenant durant l'infection naturelle. Ces vaccins vivants doivent être utilisés avec précaution chez certains patients, notamment immunodéprimés. Il existe trois vaccins atténués vivants actuellement en développement préclinique, en particulier le vaccin CodaVax-COVID de Codagenix (NY, É.-U.), en collaboration avec le Serum Institute of India (30).

C) Les vaccins utilisant la protéine Spike recombinante

Certains vaccins utilisent la protéine Spike ou son domaine RBD (*Receptor Binding Domain*). Le gène S, porté dans des vecteurs plasmidiques ou viraux (Baculovirus), est transfecté dans des cellules d'insectes, de mammifères, de plantes, dans des levures ou encore des bactéries (*Escherichia coli*). Ainsi peut-on produire en grandes quantités la protéine Spike purifiée, que l'on peut éventuellement incorporer dans des particules dites *Virus-Like Particles* (VLP). Pour améliorer son antigénicité, on peut inclure des mutations stabilisatrices et des domaines de trimérisation ou même utiliser différents modes de purification (protéines solubles versus *membrane extraction*). L'avantage de ces vaccins est qu'ils peuvent être réalisés sans manipulation du virus lors du processus de production. De plus, l'utilisation des vaccins protéiques recombinants bénéficie d'une expérience considérable pour la production, car ils ont été largement déployés dans le passé, notamment pour diffé-

rents vaccins antigrippaux licenciés. Cependant, la protéine Spike est assez difficile à exprimer. Toujours est-il que ces vaccins sortent du stade préclinique et que plusieurs d'entre eux sont entrés dans des essais cliniques de phase I et II, tels que le vaccin NVX-CoV2573 de Novavax (Gaithersburg, MD, É.-U) pour lequel la protéine S associée à un adjuvant (nanoparticules phospholipidiques Matrix-M) a été testée sur les primates non humains et l'homme en phase II. Ces vaccins auraient l'avantage de protéger les voies aériennes supérieures et donc de stopper la contagion. Ils nécessitent deux injections et donnent une très bonne immunité cellulaire et humorale (31). Un vaccin similaire est développé par Sanofi.

D) Les vecteurs non réplicatifs

Les vecteurs non réplicatifs représentent un grand groupe de vaccins en développement. Ils sont fondés sur l'utilisation d'un virus hétérologue incapable de se répliquer par délétion sélective de son génome, dans lequel est inséré le gène codant la protéine Spike. Dans la majorité des cas, on recourt à un adénovirus (AdV), plus rarement au virus vaccinal Ankara, aux virus influenzae ou parainfluenzae humains, au virus Sendai, etc.. Ils sont administrés par voie musculaire, pénètrent les cellules dendritiques des vaccinés qui expriment la protéine virale, ce qui induit une forte réponse immunitaire humorale. Ils ne nécessitent pas la manipulation de virus vivant pour leur production. On a une bonne expérience de cette approche déjà utilisée pour un vaccin contre le virus Ebola (Janssen/Johnson & Johnson) avec un adénovirus (32). L'inconvénient est que certains vecteurs viraux peuvent être partiellement neutralisés par une immunité préexistante, notamment s'il convient de faire deux injections réactivant une immunité résiduelle. Cette difficulté peut être contournée en employant des virus rarement rencontrés chez l'homme, dérivés de virus animaux, ou bien un virus contre lequel une immunité naturelle est faible (adénovirus).

Ces vaccins sont très efficaces chez les primates non humains (33) et plusieurs sont en développement. On peut citer le vaccin Oxford ChAdOx1 CoV-19, produit par AstraZeneca et le Serum Institute of India, qui met en jeu un adénovirus non réplicatif et qui a fait l'objet de plusieurs publications des différents essais cliniques jusqu'à la phase III (34-38). D'autres vaccins de même type (chinois, russe et américain) abordent ou finissent la phase III : les vaccins AdV-5 de CanSino (39, 40), Ad26 et Ad5 (dit Spounik V) du Gamaleya Research Institute (41) et AdV26 de Janssen/Johnson & Johnson (42). Ils confèrent une bonne immunité humorale et cellulaire et occasionnent des effets secondaires mineurs, mais assez fréquents (fatigue, mal de tête, fièvre).

E) Les vecteurs réplicatifs

Les vecteurs sont dérivés de souches vaccinales ou atténuées de divers virus qui ont été préparés pour exprimer le gène codant la protéine Spike. Cette approche peut induire une immunité robuste, car le vecteur se multiplie chez le vacciné et stimule aussi une bonne réponse de l'immunité innée. De plus, ces vaccins peuvent être administrés par voie nasale, déclenchant ainsi une immunité locale par production d'IgA sécrétoires. Il existe actuellement des essais cliniques de phase I/II, notamment ceux avec le virus vaccinal contre la rougeole développé par l'Institut Pasteur et Merck (43), et le virus influenza développé par Beijing Wantai Biological Pharmacy, administrable par voie nasale (44). Plusieurs autres vecteurs sont aussi envisagés, virus de la stomatite vésiculaire, herpes, virus Newcastle.

F) Les vecteurs viraux inactifs

Certains vaccins sont des virus hétérologues inactivés qui expriment la protéine Spike à leur surface. L'inactivation rend ces vaccins plus sûrs et ils peuvent ainsi être administrés à des sujets immunodéprimés. Les taux d'antigènes peuvent être facilement standardisés, comme pour les vaccins protéiques. On peut citer le vaccin utilisant le virus NDV (*Newcastle Disease Virus*) (45). Ces technologies sont encore au stade préclinique.

G) Les vaccins ADN

Ces vaccins sont constitués de plasmides portant le gène *spike*, dont l'expression est contrôlée par un promoteur de mammifères. La protéine est produite *in vivo* après l'injection du plasmide recombinant. L'avantage de cette technologie est la facilité de production vaccinale à grande échelle dans *E. coli* et la bonne stabilité des plasmides. Cependant, ces vaccins ont souvent une faible immunogénicité, et ils doivent être administrés avec les techniques de relargage nanoparticulaire pour les rendre plus efficaces. Quatre vaccins à ADN sont actuellement en phase I/II des essais cliniques (30).

H) Les vaccins ARN, une nouvelle ère pour la vaccinologie

Les approches conventionnelles recourant soit à des vaccins atténués ou inactivés, soit à des antigènes vaccinaux, confèrent toutes une protection durable contre de nombreux agents infectieux dangereux. Cependant, leur production requiert une longue mise au point, ce qui est un obstacle lors de l'émergence, de plus en plus fréquente, de nouveaux agents pathogènes viraux, qui nécessitent de façon urgente

des vaccins protecteurs. La première utilisation d'ARN messenger (ARNm) conduisant à la synthèse d'une protéine chez l'animal de laboratoire remonte à 1990 (46). Toutefois, au cours des trois dernières décennies, cette approche a rencontré plusieurs écueils : a) l'ARN nu ne peut pas spontanément pénétrer les cellules, notamment après injection intradermique ; b) il est particulièrement instable et rapidement dégradé par les ARNases tissulaires ; c) il induit une forte réponse inflammatoire par stimulation de l'immunité innée. Cela explique la faible efficacité vaccinale et les effets secondaires observés lors des premières injections d'ARN chez l'animal.

Des innovations technologiques majeures au cours de la dernière décennie ont permis de surmonter ces obstacles. Une première étape de mise au point de vaccins ARN contre le SARS-CoV-2 a été de synthétiser l'ARNm viral codant pour la protéine Spike. On a réussi à le produire *in vitro*, similaire à l'ARNm mature obtenu dans le cytoplasme des cellules infectées (47), grâce à une ARN polymérase du phage T4. Dès lors, on peut apporter des améliorations à la séquence de l'ARN d'intérêt au cours de cette synthèse *in vitro*. Le premier objectif est de diminuer la stimulation de l'immunité innée par l'ARNm. En effet, le processus de synthèse de l'ARNm entraîne de fortes contaminations avec des ARN bicaténares qui stimulent fortement la production d'interféron de type I (48). L'ARNm vaccinal doit donc être purifié pour éliminer ces ARN nuisibles. Il demeure que les ARN monocaténares sont eux-mêmes des PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) quand ils sont administrés dans les tissus. Ils sont détectés par certains récepteurs de l'immunité innée (*Toll-Like Receptor* [TLR] 7 et 8), d'où une production d'interféron de type I. La biochimiste hongroise Katalina Karikó et Drew Weissman ont proposé d'incorporer, dans la séquence de l'ARNm, des nucléosides modifiés qui atténuent considérablement cette réaction de l'immunité innée contre l'ARNm. Il s'agit notamment de la pseudouridine, de la 1-méthyl-pseudouridine ou de la 5-méthyl-cytidine, qui réduisent fortement la production d'interféron de type I (49-50). Le second objectif est de rendre la traduction de l'ARNm plus efficace *in vivo*, en particulier dans les cellules dendritiques. Sa séquence a ainsi été modifiée : on a augmenté la teneur en GC et éliminé les régions non traduites ou les codons rares (remplacés par des codons synonymes courants) pour optimiser la lecture de l'acide nucléique par les ribosomes. Par ailleurs, on a aussi ajouté à l'ARN synthétisé, des nucléotides aidant sa traduction: en 5', une méthyl-guanosine (« coiffe »), et en 3', une séquence répétée d'adénosine (« queue polyA »). Enfin, fallait-il trouver un moyen pour que l'ARN exogène puisse franchir la barrière de la membrane cellulaire lipidique et pénétrer le cytoplasme pour être traduit en protéines. Pour cela, les vaccins à ARNm ont bénéficié des remarquables progrès dans le domaine des nanoparticules lipidiques (51),

habituellement constituées d'un lipide cationique lié à du polyéthylène glycol, de cholestérol et de phospholipides naturels qui consolident la structure en bicouche lipidique. L'ARNm est alors inclus dans les nanoparticules (52) (Figure 3). Ces vaccins sont injectés par voie intramusculaire (ou intradermique). Les nanoparticules pénètrent les cellules musculaires et les cellules dendritiques recrutées où la protéine d'intérêt est présentée en association aux molécules de CMHI/II aux lymphocytes et induit l'immunité protectrice (Figure 4). Très fragiles, ils doivent être conservés à basse température (-70 °C à -20 °C).

Il existe aujourd'hui deux principaux types de vaccins ARN : ceux constitués d'un ARNm non répliquatif, dérivé du virus, et ceux utilisant l'ARN « auto-amplifié », qui inclut une machinerie de réplication virale dans l'ARNm viral permettant une amplification intracellulaire et une production plus abondante de protéines (53). Seuls les premiers sont en cours d'utilisation chez l'homme. Les vaccins ARNm employés actuellement ont d'énormes avantages. Tout d'abord, ils sont faciles à produire *in vitro* par synthèse, sans aucun danger : l'ARNm est non infectieux, sans risque d'intégration dans l'ADN, et son immunogénicité est fortement atténuée par la purification des ARN monocaténares et l'optimisation de sa séquence. Enfin, l'utilisation de nanoparticules lipidiques permet à cet ARN d'accéder directement au cytoplasme des cellules dendritiques avant d'être traduit en protéines. Les vaccins ARN induisent une forte réponse

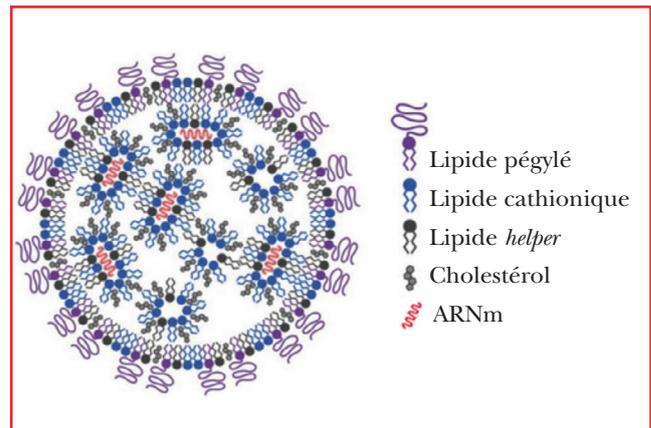


Fig. 3 - Schéma d'une nanoparticule portant l'ARNm.

lymphocytaire CD4⁺ et CD8⁺ et ils confèrent une forte immunité protectrice contre de nombreux agents infectieux dans les modèles animaux.

Les premières publications sur les vaccins ARN contre des agents infectieux remontent à 2012, d'abord pour un vaccin contre la grippe (54), puis contre la rage (55). Ils ont été aussi utilisés contre le virus Zika chez les primates, puis dans des essais cliniques (56, 57). Toutes ces recherches ont profité pour la mise au point d'un vaccin ARNm contre le SARS-CoV-2. Les deux vaccins ARNm en cours d'utilisation conditionnelle à grande échelle sont le vaccin mRNA-1273 de Moderna et le vaccin BNT162 (Comirnaty®)

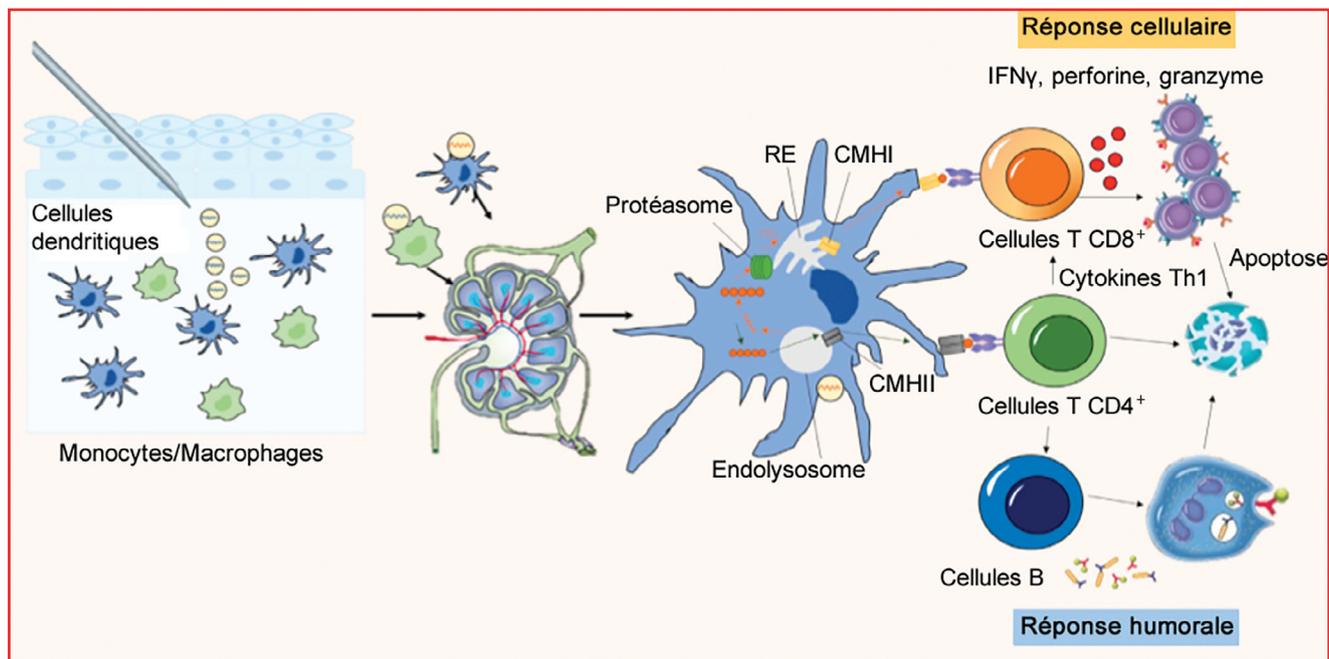


Fig. 4 - Schéma de l'immunisation par un vaccin ARNm.

Les nanoparticules lipidiques contenant l'ARNm sont capturées, au site d'injection, par des cellules dendritiques et des macrophages qui sont drainés secondairement vers le ganglion lymphatique proximal. Après traduction de l'ARNm, la protéine correspondante est processée dans le protéasome du cytoplasme de ces cellules puis présentée, en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, activant ainsi à la fois une réponse humorale et cellulaire. D'après (52).

IFN γ : interféron gamma ; RE : réticulum endoplasmique ; CMHI : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ; CMHII : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.

de BioNTech-Pfizer. Ces vaccins sont bien tolérés d'après les résultats des essais cliniques de phase III, chacun portant sur 60 000 personnes, avec cependant des effets secondaires, mineurs, mais assez fréquents (fatigue, fièvre, rougeur cutanée...), comme pour beaucoup d'autres vaccins. Le vaccin Pfizer semble être très bien supporté par la population. Il est actuellement mis en œuvre aux États-Unis où deux millions de personnes ont été vaccinées, en Grande-Bretagne avec 617 000 vaccinées en trois semaines, en Allemagne et dans d'autres pays européens. Il convient de souligner que ce vaccin doit être utilisé avec prudence chez les personnes allergiques.

Le vaccin mRNA-1273-45 de Moderna est constitué d'un ARNm porteur de l'information d'un fragment du gène *spike* codant uniquement le domaine RBD de la protéine S. Il induit chez les macaques un fort taux d'anticorps neutralisants, protégeant les animaux d'une surinfection, avec élimination du virus des voies aériennes supérieures en un à quatre jours (58-60). Sur l'homme, la phase I d'étude de ce vaccin a démarré dès mars 2020 sur des volontaires de 18 à 55 ans, et les phases II et III ont été franchies avec succès, confirmant une très forte protection contre la Covid-19. Concernant le vaccin produit par BioNTech-Pfizer, les résultats des essais des phases I/II de deux vaccins ARNm très proches, BNT162b1 et BNT162b2, ont été publiés, incluant un groupe de sujets âgés de 65 à 85 ans qui développent une moins bonne réponse anticorps par rapport aux groupes d'individus plus jeunes. Le vaccin BNT162b2 qui produit la protéine Spike entière a finalement été sélectionné pour la phase III qui a enrôlé 43 548 participants à l'essai (61-64). Les deux vaccins ARNm confèrent une protection de près de 95 % et ont été homologués en décembre 2020.

Jusqu'ici, les vaccins utilisant des micro-organismes de virulence atténuée ou inactivés, ou encore des facteurs de virulence purifiés (toxines, adhésines...), sont injectés éventuellement avec un adjuvant pour induire une réponse immunitaire efficace. L'utilisation de ces nouveaux vaccins ARNm, sans addition d'adjuvant, est une véritable révolution technologique qui ouvre une nouvelle ère pour la vaccinologie pour lutter contre les maladies infectieuses, mais aussi contre, par exemple, le cancer (65).

V. - CONCLUSION

Les résultats des essais cliniques en phase III des candidats vaccins contre le SARS-CoV-2 sont très encourageants. Dans l'ensemble, ils confèrent une bonne protection, surtout les vaccins ARNm, et sont bien tolérés. Les comparaisons entre les différents vaccins en cours de développement demeurent difficiles, car les effectifs, les tranches d'âge, les méthodologies

et les modes d'administration sont très variés. Cependant, il semble exister un gradient dans le niveau de protection, depuis les vaccins inactivés et ceux à vecteurs non réplicatifs (AdV5,...), jusqu'aux vaccins à ARNm et à protéines recombinantes. Tous induisent l'apparition d'anticorps neutralisants, à l'instar de l'infection naturelle, ce qui apparaît comme un indicateur précieux et fiable d'efficacité. Très récemment, lors d'une épidémie de Covid-19 survenue sur un bateau de pêche et très bien suivie, il a été constaté que seules les rares personnes séropositives, préalablement à l'embarquement, avaient été épargnées (66).

La plupart des vaccins requérant deux injections pour l'obtention d'une protection efficace recourent à une administration par la voie musculaire, ce qui entraîne une forte production d'IgG qui préserve les voies respiratoires inférieures, mais pas le nasopharynx dont la protection nécessite la présence locale d'IgA sécrétoire. Cependant, il est possible que de faibles quantités d'IgG puissent être présentes dans les voies aériennes supérieures, particulièrement s'il y a un très fort titre d'anticorps sériques. D'après les expériences chez les primates non humains, la plupart des vaccins protègent seulement contre des infections des voies respiratoires inférieures, mais pas contre un portage asymptomatique transitoire, et le taux de virus dans les voies aériennes supérieures de ces animaux, lors de la réinfection, demeure plus faible et de durée raccourcie. Les vaccins vivants atténués et les vecteurs viraux en cours de développement pourraient être utilisés par voie nasale pour induire localement une forte immunité mucoale. Reste la question de la durée de l'immunité protectrice après vaccination. Dans l'infection naturelle, la protection peut durer jusqu'à six à huit mois. Il est possible que, si le virus persiste, l'on doive faire des revaccinations comme pour de nombreux autres virus. La moindre activité de ces vaccins chez les personnes âgées pourrait aussi demander d'adapter les formulations des vaccins et d'utiliser des adjuvants.

Au total, le principal défi de la vaccination contre la Covid-19 est de convaincre la population du bénéfice sanitaire et de l'innocuité du vaccin. La communication transparente est alors primordiale pour rétablir la confiance, de même que la lutte contre les informations mensongères (*fake news*). L'autre défi est logistique : comment vacciner des centaines de millions d'individus par des vaccins requérant deux injections et conservés à basse température ? Quoi qu'il en soit, la mise en œuvre rapide de la vaccination contribuera à sauver des vies, à diminuer les hospitalisations dans les services de réanimation et donc à réduire les contraintes sur le système de santé, qui se font souvent au détriment d'autres pathologies graves. Leur déploiement rapide s'avère un enjeu capital pour sortir de la pandémie de la Covid-19.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Rev Microbiol* 2019; **17** : 181-92.
- (2) Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Thoelen I, Wollants E, *et al.* Complete genomic sequence of human coronavirus OC43 : molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J Virol* 2005; **79** : 1595-1604.
- (3) Randolph HE, Barreiro LB. Herd immunity : understanding COVID-19. *Immunity* 2020; **52** : 737-41.
- (4) Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, *et al.* Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* 2020; **181** : 1489-1501.
- (5) Ni L, Ye F, Cheng ML, Deng YQ, Zhao H, Wei P, *et al.* Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity* 2020; **52** : 971-7.
- (6) Berche P. La pandémie de Covid-19. *Rev Biol Méd* 2020; **356** : 1-17.
- (7) Kang H, Wang Y, Tong Z, Liu X. Retest positive for SARS-CoV-2 RNA of "recovered" patients with COVID-19 : persistence, sampling issues, or re-infection? *J Med Virol* 2020; **92** : 2263-5.
- (8) Tillett RL, Sevinsky JR, Hartley PD, Kerwin H, Crawford N, Gorzalski A, *et al.* Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2 : a case study. *Lancet Infect Dis* 2021; **21** : 52-8.
- (9) The Severe Covid-19 GWAS Group. Genome-wide association study of severe Covid-19 with respiratory failure. *N Engl J Med* 2020; **383** : 1522-34.
- (10) COVID-19 Host Genetics Initiative. The COVID-19 Host Genetics Initiative, a global initiative to elucidate the role of host genetic factors in susceptibility and severity of the SARS-CoV-2 virus pandemic. *Eur J Hum Genet* 2020; **28** : 715-8.
- (11) Zeberg H, Pääbo S. The major genetic risk factor for severe COVID-19 is inherited from Neandertals. *Nature* 2020; **587** : 610-2.
- (12) Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, *et al.* Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 2020; **370** : eabd4570.
- (13) Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, *et al.* A crucial role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nature Med* 2005; **11** : 875-9.
- (14) Ziegler CG, Allon SJ, Nyquist SK, Mbano IM, Miao VN, Tzouanas CN, *et al.* SARS-CoV-2 receptor ACE-2 is an interferon stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell* 2020; **181** : 1016-35.
- (15) Cheng H, Wang Y, Wang GQ. Organ protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19. *J Med Virol* 2020; **92** : 726-30.
- (16) Hui KP, Cheung MC, Perera RA, Ng KC, Bui CH, Ho JC, *et al.* Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. *Lancet Resp Med* 2020; **8** : 687-95.
- (17) Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, *et al.* SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nature Med* 2020; **26** : 681-7.
- (18) Ni L, Ye F, Cheng ML, Feng Y, Deng YQ, Zhao H, *et al.* Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity* 2020; **52** : 971-7.
- (19) Gidari A, Nofri M, Saccarelli L, Bastianelli S, Sabbatini S, Bozza S, *et al.* Is recurrence possible in coronavirus disease 2019 (COVID-19)? Case series and systematic review of literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2021; **40** : 1-12.
- (20) Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Faliti CE, Ramirez SI, *et al.* Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for greater than six months after infection. *bioRxiv* 2020; doi.org/10.1101/2020.11.15.383323.
- (21) Deng W, Bao L, Liu J, Xiao C, Liu J, Xue J, *et al.* Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques. *Science* 2020; **369** : 818-23.
- (22) Schindewolf C, Menachery VD. Middle East respiratory syndrome vaccine candidates: cautious optimism. *Viruses* 2019; **11** : 74.
- (23) Zhu M. SARS immunity and vaccination. *Cell Mol Immunol* 2004; **1** : 193-8.
- (24) Kramer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* 2020; **586** : 516-27.
- (25) Gao Q, Bao L, Mao H, Wang L, Xu K, Yang M, *et al.* Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science* 2020; **369** : 77-81.
- (26) Xia S, Zhang Y, Wang Y, Wang H, Yang Y, Gao FG, *et al.* Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial *Lancet Infect Dis* 2021; **21** : 39-51.
- (27) Xia S, Duan K, Zhang Y, Zhao D, Zhang H, Xie Z, *et al.* Effect of an inactivated vaccine against SARS-CoV-2 on safety and immunogenicity outcomes: interim analysis of 2 randomized clinical trials. *JAMA* 2020; **324** : 951-60.
- (28) Talon J, Salvatore M, O'Neill RE, Nakaya Y, Zheng H, Muster T, *et al.* Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: a vaccine approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020; **97** : 4309-14.
- (29) Broadbent AJ, Santos CP, Anafu A, Wimmer E, Mueller S, Subbarao K. Evaluation of the attenuation, immunogenicity, and efficacy of a live virus vaccine generated by codon-pair bias de-optimization of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus, in ferrets. *Vaccine* 2016; **34** : 563-70.
- (30) World Health Organization. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines (WHO, accessed 26 September 2020).
- (31) Keech C, Albert G, Cho I, Robertson A, Reed P, Neal S, Pledsted JS, *et al.* Phase 1-2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N Engl J Med* 2020; **383** : 2320-32.
- (32) Mooney T, Smout E, Leigh B, Greenwood B, Enria L, Ishola D, *et al.* EBO-VAC-Salone: lessons learned from implementing an Ebola vaccine trial in an Ebola-affected country. *Clin Trials* 2018; **5** : 436-43.
- (33) Mercado NB, Zahn R, Wegmann F, Loos C, Chandrashekar A, Yu J, *et al.* Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature* 2020; **586** : 583-8.
- (34) Graham SP, McLean RK, Spencer JA, Belij-Rammerstorfer S, Wright D, Ulaszewska M, *et al.* Evaluation of the immunogenicity of prime-boost vaccination with the replication-deficient viral vectored COVID-19 vaccine candidate ChAdOx1 nCoV-19. *NPJ Vaccines* 2020; **5** : 69.
- (35) van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, Belij-Rammerstorfer S, Purushotham JN, Port JR, *et al.* ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature* 2020; **586** : 578-82.
- (36) Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, *et al.* Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2020; **396** : 467-78.
- (37) Voysey M, Costa Clemens SA, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, *et al.* Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* 2021; **397** : 99-111.

- (38) Ramasamy MN, Minassian AM, Ewer KJ, Flaxman AL, Folegatti PM, Owens DR, *et al.* Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *Lancet* 2020; **396** : 1979-93
- (39) Zhu FC, Li YH, Guan XH, Hou LH, Wang WJ, Li JX, *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet* 2020 ; **395** : 1845-54.
- (40) Zhu FC, Guan XH, Li YH, Huang JY, Jiang T, Hou LH, *et al.* Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2020 ; **396** : 479-88.
- (41) Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatullin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, *et al.* Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet* 2020 ; **396** : 887-97.
- (42) Sadoff J, Le Gars M, Shukarev G, Heerwegh D, Truyers C, de Groot AM, *et al.* Safety and immunogenicity of the Ad26.COV2.S COVID-19 vaccine candidate: interim results of a phase 1/2a, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *medRxiv*; 25 September 2020, doi.org/10.1101/2020.09.23.20199604
- (43) Institut Pasteur. COVID-19 : vaccine against SARS-CoV-2 infection, using the measles vector. www.pasteur.fr/en/all-sars-cov-2-covid-19-institut-pasteur/researchprojects/covid-19-vaccine-against-sars-cov-2-infection-using-measles-vector
- (44) GlobalData. COVID-19 vaccine administered by nasal spray receives approval in China for Phase I study. www.globaldata.com/covid-19-vaccine-administered-nasalspray-receives-approval-china-phase-i-study/
- (45) Sun W, McCroskery S, Liu WC, Leist SR, Liu Y, Albrecht RA, *et al.* A Newcastle disease virus (NDV) expressing membrane-anchored spike as a cost-effective inactivated SARS-CoV-2 vaccine. *BioRxiv* 2020 ; doi.org/10.1101/2020.07.30.229120.
- (46) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990 ; **247** : 1465-8.
- (47) Thi Nhu Thao T, Labrousseau F, Ebert N, V'kovski I P, Stalder H, Portmann J, *et al.*, Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature* 2020 ; **582** : 561-5.
- (48) Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res* 2011 ; **39** : e142.
- (49) Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther* 2008 ; **16** : 1833-40.
- (50) Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt SC, Weiss R, Sanders NN, Kitada T. N¹-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J Control Release* 2015 ; **217** : 337-44.
- (51) Evers MJ, Kulkarni JA, van der Meel R, Cullis PR, Vader P, Schiffelers RM. State-of-the-art design and rapid-mixing production techniques of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery. *Small Methods* 2018 ; **2** : 1700375.
- (52) Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery. *Mol Ther* 2019 ; **27** : 710-28.
- (53) Bloom K, van den Berg F, Arbuthnot P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Ther* 2020; October 22, doi.org/10.1038/s41434-020-00204-y.
- (54) Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, Voss D, *et al.* Protective efficacy of *in vitro* synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat Biotechnol* 2012 ; **30** : 1210-6.
- (55) Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, Mehr KT, Backert L, Finak G, *et al.* Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet* 2017 ; **390** : 1511-20.
- (56) Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, Muramatsu H, Andersen H, DeMaso CR, *et al.* Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature* 2017 ; **543** : 248-51.
- (57) Richner JM, Himansu S, KA Dowd, Butler SL, Salazar V, Fox JM, *et al.* Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. *Cell* 2017 ; **168** : 1114-25.
- (58) Richner JM, Jagger BW, Shan C, Fontes CR, Dowd KA, Cao B, Himansu S, *et al.* Vaccine mediated protection against Zika virus-induced congenital disease. *Cell* 2017 ; **170** : 273-83.
- (59) Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, *et al.* An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 — preliminary report. *N Engl J Med* 2020 ; **383** : 1920-31.
- (60) Anderson EJ, Roupheal NG, Widge AT, Jackson LA, Roberts PC, Makhene M, *et al.* Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults. *N Engl J Med* 2020 ; **383** : 2427-38.
- (61) Widge AT, Roupheal NG, Jackson LA, Anderson EJ, Roberts PC, Makhene M, *et al.* Durability of responses after SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *N Engl J Med* 2021 ; **384** : 80-2.
- (62) Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, *et al.* Phase 1/2 study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* 2020 ; **586** : 589-93.
- (63) Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, *et al.* Safety and immunogenicity of two RNA-based Covid-19 vaccine candidates. *N Engl J Med* 2020 ; **383** : 2439-50.
- (64) Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, *et al.* Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med* 2020 ; **383** : 2603-15.
- (65) Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA, a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* 2018; **17** : 261-79.
- (66) Addetia A, Crawford KH, Dingsens A, Zhu H, Roychoudhury P, Huang ML, *et al.* Neutralizing antibodies correlate with protection from SARS-CoV-2 in humans during a fishery vessel outbreak with high attack rate. *J Clin Microbiol* 2020 ; **58** : e02107-20.