

► Le 2 octobre 2023, le prix Nobel de physiologie ou médecine a été décerné à Katalin Karikó et Drew Weissman, tous deux professeurs à l'université de Pennsylvanie, pour leur « découverte concernant les modifications des nucléosides qui ont permis le développement de vaccins ARN efficaces contre le COVID-19 ». Le communiqué du comité Nobel indique que « grâce à leurs découvertes exceptionnelles qui ont changé radicalement notre compréhension des mécanismes par lesquels l'ARN messager interagit avec notre système immunitaire, ces deux lauréats ont contribué au développement, avec une rapidité sans précédent, d'un vaccin contre l'une des plus grandes menaces des temps modernes affectant la santé humaine ». ◀

Prix Nobel de physiologie ou médecine 2023

Katalin Karikó et Drew Weissman

Une révolution vaccinale portée par la recherche fondamentale en immunologie et en biologie moléculaire

Marie-Caroline Dieu-Nosjean, Jean-Luc Teillaud



Laboratoire « Microenvironnement immunitaire et immunothérapie », Centre d'immunologie et des maladies infectieuses (CIMI), Inserm U1135, Faculté de Santé, Sorbonne université, Paris, France.

marie-caroline.dieu-nosjean@inserm.fr

jean-luc.teillaud@inserm.fr

Les prémisses d'une découverte

Mais comment cette découverte qui a sauvé des millions de vies humaines à travers le monde a-t-elle été faite ? Il faut remonter bien avant 2005, année de la publication dans la revue *Immunity* de l'un des articles majeurs de la découverte de Katalin Karikó et Drew Weissman [1]. La démonstration qu'il est possible d'utiliser des ARNm codant des protéines virales capables d'induire *in vivo* une réponse immunitaire adaptative spécifique contre un virus en enfermant ces ARNm dans des vésicules lipidiques chargées positivement (ce qui leur permet de fusionner avec la membrane plasmique des cellules, chargée négativement), les liposomes, avait été en effet publiée en 1993 par Frédéric Martinon et ses collègues* [2]. L'approche que ces chercheurs avaient utilisée était fondée sur la démonstration, faite en 1990, qu'il était possible de détecter transitoirement les activités de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) et de la luciférase dans les muscles squelettiques de souris après une injection intramusculaire d'ARN codant ces

protéines [3]. La question s'était alors posée aux immunologistes de savoir s'il était possible de générer des lymphocytes T cytotoxiques (CTL, pour *cytotoxic T lymphocytes*) dirigés contre des cellules infectées par un virus en utilisant de l'ARN codant une protéine de ce virus ? C'est à cette question que répondirent positivement Frédéric Martinon et ses collègues en injectant par voie sous-cutanée ou intraveineuse des liposomes contenant l'ARNm codant la nucléoprotéine (NP) du virus influenza [2]. Cette étude pionnière posait ainsi les bases d'une nouvelle approche vaccinale, résumée dans leur conclusion comme un « concept de vaccination utilisant les ARNm »¹, permettant de contourner deux problèmes majeurs que le monde de la vaccination rencontre : la difficulté de produire à une échelle industrielle des protéines recombinantes à usage vaccinal et celle de lever les barrières dressées par les agences de régulation concernant les questions de sécurité posées lorsque des vecteurs ADN sont utilisés pour vectoriser des transgènes. Mais, comme nous allons le voir, la route était encore longue à parcourir avant que les questions scientifiques et techniques qu'une telle approche posait pour en faire une stratégie vaccinale maîtrisée à l'échelle industrielle ne soient résolues !

Avant d'en arriver à ce stade, plusieurs questions scientifiques se posaient à la suite de ce travail : 1) comment l'injection d'ARNm encaps-

Vignette (© Niklas Elmhed - Nobel Prize Outreach).

* Les auteurs de ces travaux de recherche étaient issus d'une collaboration entre Pasteur Mérieux Sérums & Vaccins (Marcy l'Étoile), Transgène (Illkirch), l'Institut Cochin de génétique moléculaire (Paris) et l'Inserm U152 (Paris).

¹ « The concept of using mRNA for vaccination purpose... ».

1

Katalin Karikó est née en 1955 à Szolnok en Hongrie et a obtenu son Doctorat de Sciences à l'université de Szeged, toujours en Hongrie, où elle a aussi effectué un premier post-doctorat à l'institut de biophysique de l'académie des sciences, jusqu'en 1985. Ayant réussi à gagner les États-Unis, elle a alors accumulé les stages postdoctoraux, d'abord dans le département de biochimie de l'université publique Temple à Philadelphie (1986-1987), puis dans le département d'anatomo-pathologie de l'université fédérale des sciences de la santé (*Uniformed Services University of the Health Sciences*, USU) à Bethesda (1988-1989). Ayant obtenu en 1989 un poste d'*Assistant Professor* à l'université de Pennsylvanie, c'est là qu'elle a mené ses travaux jusqu'en 2013, dont une partie en collaboration avec le co-récepteur du prix Nobel, Drew Weissman. Européenne dans l'âme, elle a alors rejoint à Mayence (Allemagne) la firme *BioNTech RNA Pharmaceuticals*, fondée par Uğur Şahin, Christoph Huber et Özlem Türeci, en tant que vice-présidente puis senior vice-présidente de cette compagnie. Depuis 2021, elle est professeure à l'université de Szeged et professeure associée à la faculté de médecine Perelman de l'université de Pennsylvanie.



<https://u-szeged.hu/english>
<https://www.temple.edu/>
<https://www.usuhs.edu/>
<https://www.med.upenn.edu/>
<https://www.biontech.com/int/en/home.html>

sulés dans des liposomes aboutissait-elle à ce que les immunologistes appellent la sensibilisation de lymphocytes T CD8⁺ (le *priming*) et leur différenciation en lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques de peptides viraux exprimés en association avec les molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH-I) par les cellules infectées ; 2) comment disposer d'ARNm ayant une stabilité suffisante pour les injecter *in vivo* sans qu'ils soient très vite dégradés et 3) comment permettre leur traduction en protéine virale en quantités suffisantes dans les cellules responsables de la sensibilisation des lymphocytes T ? À cette troisième question, allait d'ailleurs s'en ajouter une quatrième, celle de la maîtrise de la réponse inflammatoire que la présence de ces ARNm dans ces cellules déclenchait et qui, lorsqu'elle est trop forte, peut conduire à des effets indésirables graves.

Dans leur article, Frédéric Martinon et ses collègues avaient émis l'hypothèse que les macrophages étaient susceptibles de remplir ce rôle de sensibilisation des lymphocytes T CD8⁺ [2]. En fait, il était apparu, au cours des années 1990, que les cellules candidates les plus efficaces pour effectuer ce travail d'apprêtement et de présentation de peptides associés à des molécules du CMH-I après fusion de leurs membranes avec des liposomes étaient les cellules dendritiques, véritables relais entre immunité innée et immunité adaptative, comme

l'ont montré les travaux pionniers de Ralph M. Steinman, l'un des récipiendaires du prix Nobel de physiologie ou médecine en 2011 [4, 5, 30] (→).

(→) Voir le Repères Nobel 2011 de L. Zitvogel et al., m/s n° 11, novembre 2011, page 1028

Du fait de ce rôle à la croisée des chemins entre immunité innée et immunité adaptative, les cellules dendritiques faisaient alors l'objet de très nombreuses études, tant en ce qui concerne leurs phénotypes selon leur localisation tissulaire et leur degré de maturation, que leurs fonctions.

Le hasard d'une rencontre pleine d'avenir

Drew Weissman, formé à l'immunologie cellulaire, participait alors activement à ces études sur les cellules dendritiques dans son laboratoire à l'université de Pennsylvanie à Philadelphie [6], comme il l'avait déjà fait au cours de son stage post-doctoral dans le laboratoire dirigé par Anthony Fauci aux *National Institutes of Health* (NIH) à propos du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (voir l'*Encadré 2* à son sujet) [7, 8].

C'est alors que le hasard et la nécessité jouèrent leurs rôles ! Dans un interview disponible sur internet², Katalin Karikó et Drew Weissman expliquent qu'ils se sont rencontrés... devant une photocopieuse, tous les deux en ayant besoin pour photocopier des articles de journaux qui les intéressaient. Cette rencontre entre un immunologiste chevronné travaillant sur les cellules dendritiques et, entre autres, sur leur rôle dans l'immunogénicité des ARN, et une biochimiste, excellente spécialiste de la structure des ARN et de leurs modifications, leur permit de débiter une collaboration visant à étudier les signaux observés lorsque différents types d'ARN sont introduits dans des cellules dendritiques. Katalin Karikó était une scientifique travaillant depuis plusieurs années sur les ARNm et avait notamment développé une grande expertise concernant la transcription *in vitro* des ARNm dans des systèmes acellulaires (appelés *IVT mRNA* pour *in vitro-transcribed mRNA*), leur transfection et leur traduction *in vitro* dans les cellules eucaryotes [9, 10], et, *in vivo*, par injection dans des tissus. Inspirée par les travaux publiés plus de dix ans auparavant par Richard Malone et ses collègues montrant qu'il était possible de transférer des cellules avec des ARNm encapsulés dans des liposomes ayant incorporé un lipide cationique [11], elle avait notamment montré qu'une activité de la luciférase pouvait être détectée après injection intracérébrale de l'ARNm codant cette enzyme, complexé avec la Lipofectine® (un mélange lipidique qui forme des liposomes en milieu aqueux, permettant l'encapsulation

² <https://www.youtube.com/watch?v=-3x4IMdeFdI>



2

Drew Weissman est né en 1959 à Lexington (Massachusetts) aux États-Unis. En 1987, après avoir reçu une double formation médicale et scientifique à l'université de Boston (programme MD/PhD), il poursuit ses études de médecine à la faculté de médecine Harvard, puis effectue un stage post-doctoral dans le laboratoire d'Anthony Fauci à l'institut des maladies infectieuses et de l'allergie des instituts nationaux de la santé (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, NIAID - NIH*) américains. Il fonde ensuite son propre laboratoire de recherche en 1997 à la faculté de médecine Perelman de l'université de Pennsylvanie à Philadelphie. Il y est actuellement professeur de vaccinologie et directeur du *Penn Institute* de recherche sur les ARN et leur ingénierie.



<https://www.bu.edu/>

<https://www.bidmc.org/>

<https://www.niaid.nih.gov/>

<https://www.med.upenn.edu/>

<https://rnainnovation.med.upenn.edu/>

des ARNm et empêchant ainsi leur rapide dégradation par les ribonucléases (RNases) [12]. De plus, sa formation initiale en Hongrie (voir *Encadré 1*) lui avait apporté de solides connaissances sur la modification chimique des ARN en général car elle avait travaillé sur des molécules impliquées dans la dégradation des ARN de transfert (ARNt) et sur les techniques biochimiques permettant d'effectuer ces modifications [13].

Réponse immunitaire anti-virale : quand cellules dendritiques et ARN s'en mêlent

Cette collaboration entre Katalin Karikó et Drew Weissman, fondée sur des savoirs complémentaires, conduisit à la démonstration *in vitro* que la transfection, dans des cellules dendritiques immatures³, d'ARNm transcrit *in vitro*, codant la protéine Gag du VIH, complexé avec la Lipofectine®, permettait la sensibilisation et l'activation de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ *in vitro* [14]. Une analyse détaillée des cellules dendritiques montra dans ce travail

que leur incubation avec l'ARNm complexé avec la Lipofectine® provoquait leur maturation, caractérisée par une expression de CD83, une expression accrue de CD80 et CD86 et une perte des capacités de macropinocytose et d'endocytose, les rendant alors capables de stimuler *in vitro* les lymphocytes T spécifiques, soit par présentation aux lymphocytes T CD8⁺ de peptides issus de la protéine Gag clivée par le protéasome, soit par sécrétion de la protéine Gag suivie de son endocytose et de sa dégradation en peptides ensuite associés aux molécules du CMH-II et présentés aux lymphocytes T CD4⁺ [14]. Remarquablement, une expression beaucoup plus importante de la protéine Gag⁴ (environ quatre à cinq fois) dans les cellules dendritiques conduisait à une forte expression de CD80, CD83 et CD86, mais à une plus faible stimulation des lymphocytes T, un phénomène lié à un accroissement de la mort des cellules dendritiques [14].

Ce travail démontrait donc la capacité des ARNm encapsulés dans des liposomes à induire une réponse T grâce à une présentation CMH-I et CMH-II de peptides Gag par des cellules dendritiques et à la délivrance d'un signal de maturation de ces cellules. Il fut suivi par une autre étude qui allait suggérer l'existence de deux mécanismes d'activation des cellules dendritiques par les ARNm contenant une queue poly-A ou pas, agissant de façon synergique, *via* d'une part l'activation d'un récepteur de nucléotides extracellulaires de type P2Y, et, d'autre part, la sécrétion de TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) [15]. Katalin Karikó et Drew Weissman avancèrent alors l'idée que les ARNm activaient fortement les cellules dendritiques par l'intermédiaire de la formation d'un ARN double brin (dsRNA, *double stranded RNA*), de façon similaire à l'activation induite par l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly (I : C)), conduisant à une production de TNF- α et d'interféron (IFN)- α , en synergie avec l'activation de ces cellules par la queue poly-A *via* un récepteur de nucléotides non identifié, induisant une production d'IL-12 [15].

Les ARN aiment les récepteurs Toll

Katalin Karikó et Drew Weissman se proposèrent alors d'examiner le rôle du récepteur *Toll-like receptor 3* (TLR3) en raison de leur connaissance d'un article qui venait d'être publié, montrant qu'un ARN double brin pouvait se fixer à ce récepteur, activant la voie NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) et induisant la production d'IFN- α [16]. TLR3 fait partie d'une famille de récepteurs, les TLR, dont la découverte⁵ permit d'établir un lien direct entre le déclenchement d'une immunité innée débutant avec la reconnaissance de motifs moléculaires dérivés de microorganismes pathogènes (les PAMP, pour *pathogen-associated molecular patterns*) et l'immunité adaptative [17, 18, 31] (→).

Cet intérêt de Katalin Karikó et Drew Weissman pour l'étude des relations ARNm/TLR était alors d'autant plus justifié que les cellules dendritiques, dont ils

(→) Voir le Repères Nobel 2011 de J.L. Imler et D. Ferrandon, m/s n° 11, novembre 2011, page 1019

³ Générées *in vitro* à partir de monocytes isolés du sang périphérique en présence de *Granulocyte-Macrophage (GM)-Colony-Stimulating Factor* (CSF) et d'interleukine (IL)-4.

⁴ Obtenue par la construction et l'utilisation d'une forme particulière de l'ARNm présentant une séquence 5'-*leader* provenant du virus de la gravure du tabac (TEV, pour *tobacco etch virus*) permettant une traduction de l'ARN sans que celui-ci soit coiffé en 5' (5'-cap, correspondant à un nucléotide modifié présent en 5' de l'ARNm).

⁵ Attribuée à Bruce B. Beutler et Jules A. Hoffmann, ce qui leur valut l'obtention du prix Nobel de physiologie ou médecine en 2011.

étudiaient les phénotypes et les fonctions lorsqu'elles étaient mises en contact d'ARNm, expriment certains de ces récepteurs *Toll-like*, dont les ligands incluent non seulement les lipopolysaccharides (LPS), la flagelline, les motifs CpG (correspondant à des dinucléotides 5'-Cytosine-phosphate-Guanine-3') non méthylés (du fait de la non méthylation de la cytosine), et les ARN double brin [16, 19], mais aussi des molécules « endogènes », dérivées de l'hôte, comme les protéines de choc thermique, les protéines du surfactant pulmonaire, des complexes chromatine-Ig (immunoglobuline)G, ainsi que des produits issus de la dégradation des matrices extracellulaires et des cellules nécrotiques [20, 21].

L'examen du rôle de TLR3 dans l'induction de la maturation par les ARNm conduisit Katalin Karikó et Drew Weissman à publier un article montrant qu'un ARNm transcrit *in vitro*, codant la protéine Gag du VIH, se fixait à TLR3, induisait une activation de la voie NF- κ B et la production d'IL-8 par des cellules de la lignée HEK (*human embryonic kidney*) TLR3⁺, et que ce phénomène pouvait être inhibé par un anticorps antagoniste anti-TLR3 [22]. De plus, cette étude montra aussi que des ARNm « endogènes », issus de cellules nécrotiques, induisaient la maturation de cellules dendritiques humaines, une expression du facteur-1 régulateur de l'interféron (IRF-1), ainsi que la sécrétion d'IFN- α , cette induction pouvant être bloquée par le traitement des extraits des cellules nécrotiques par une RNase (la benzonase) [22]. Katalin Karikó et Drew Weissman émirent alors l'hypothèse que la fixation des ARNm au TLR3 observée était due à la présence d'ARN double brin dans la structure secondaire des ARNm⁶.

La quête d'un ARN au service de l'immunité et de la vaccination

Tous les deux se mirent alors à analyser l'impact de la structure des ARN sur leur capacité à fixer certains TLR et à les activer ou pas, avec l'idée que des modifications structurales des acides nucléiques étaient à l'origine de l'engagement et de l'activation de tel ou tel TLR [1]. Cette idée résultait donc de leurs propres travaux mais aussi de travaux d'autres chercheurs travaillant sur l'impact de la modification, non pas des ARN, mais des ADN sur l'immunité innée : Hemmi et ses collègues avaient en effet montré que la sécrétion d'IFN- α et le développement d'une réponse inflammatoire étaient dus à la fixation des motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien au TLR9 [23]. Les ADN bactériens et viraux présentant une fréquence élevée de ces motifs contrairement à l'ADN de mammifères, ces auteurs avaient conclu à une capacité des récepteurs *Toll-like* à distinguer l'ADN microbien de l'ADN de mammifère, évitant ainsi le développement d'une réponse inflammatoire lorsque ce dernier est présent sous forme libre, à la suite par exemple d'une lyse cellulaire [23]. En ce qui concerne les ARN, outre leurs travaux sur TLR3 rappelés ci-dessus [22], Katalin Karikó et Drew Weissman avaient également montré avec le groupe de Brian J. Czerniecki que les ARNm bactériens ou des ARN transcrits *in vitro* ayant une structure proche

des ARNm bactériens (présentant une courte séquence poly-A), mais pas ceux dérivés de cellules eucaryotes, induisaient la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques, conduisant à un phénotype des lymphocytes T de type Th1, caractérisé par une forte production d'IFN- γ et une faible production d'IL-5 [24].

Toutes ces données, comme l'apparent paradoxe que constituait l'activation de cellules dendritiques par les ARN provenant de cellules eucaryotes nécrotiques [22] et l'absence d'activation de ces cellules lorsque des ARN totaux ou des ARNm extraits de cellules eucaryotes vivantes (cellules de la lignée cellulaire leucémique KG1, tissu cardiaque et nerveux de souris) étaient testés en comparaison avec des ARN bactériens [24], poussèrent alors Katalin Karikó et Drew Weissman à effectuer une étude approfondie de la structure des différents ARN testés : ils analysèrent la capacité d'ARN cellulaires provenant de différents compartiments cellulaires (cytoplasme, noyau, et mitochondries), d'ARN totaux, d'ARNt et d'ARNm, complexés avec la Lipofectine™, à activer des cellules dendritiques [1]. L'ARN mitochondrial, un ARN qui partage plus de caractéristiques structurales avec l'ARN bactérien qu'avec les autres types d'ARN des cellules eucaryotes, s'avéra alors l'inducteur le plus puissant de la production de TNF- α par les cellules dendritiques, alors que les ARNt se montraient incapables d'une telle induction. En raison de ces résultats, Katalin Karikó et Drew Weissman examinèrent alors les modifications post-transcriptionnelles présentes dans les nucléosides de ces différents ARN. Un patient travail de modifications des nucléosides incorporés dans des ARNm de différentes longueurs (de 0,7 à 1,9 kb) transcrits *in vitro*, au cours duquel zéro, un ou deux des quatre nucléosides avaient été remplacés par des nucléosides modifiés, dont la présence dans différents types d'ARN était déjà connue, fut entrepris. Les futurs prix Nobel parvinrent alors, en utilisant des clones de cellules HEK293 transfectées exprimant soit TLR3, soit TLR7 ou TLR8 (des récepteurs *Toll-like* choisis en raison de leurs travaux précédents sur TLR3 [22] et d'autres travaux montrant la stimulation des TLR7 et TLR8 par les ARN simple brin [25, 26]), à identifier des modifications de nucléosides (en particulier m⁶A et s²U, correspondant respectivement à la N6-méthyladénosine et à la 2-thiouridine) qui ne conduisaient pas à la production d'IL-8 par les cellules HEK *via* ces récepteurs, observée en revanche avec les ARN non modifiés.

Mais qu'en était-il de l'activation non pas de cellules HEK indicatrices transfectées mais de cellules dendritiques générées *in vitro*⁵ ou de différentes cellules dendritiques (alors appelées monocytoïdes, DC1, ou plasmacytoïdes, DC2), fraîchement isolées à partir du sang périphérique, quand ces dernières étaient traitées avec ces ARN modifiés ? Les expériences effectuées avec ces cellules

⁶ La fabrication des vaccins à ARNm inclut cependant une étape d'élimination des ARNm double brin qui peut se faire grâce à une purification sur fibres de cellulose en présence d'une solution tampon contenant de l'éthanol. Cette élimination permet d'accroître la traduction de l'ARNm grâce à une absence quasi-totale de production d'IFN- α que l'ARNm double brin induit normalement et qui diminue la traduction. Ce sont donc les TLR7 et TLR8 qui sont très majoritairement activés lors de la vaccination effectuée avec des vaccins à ARNm.

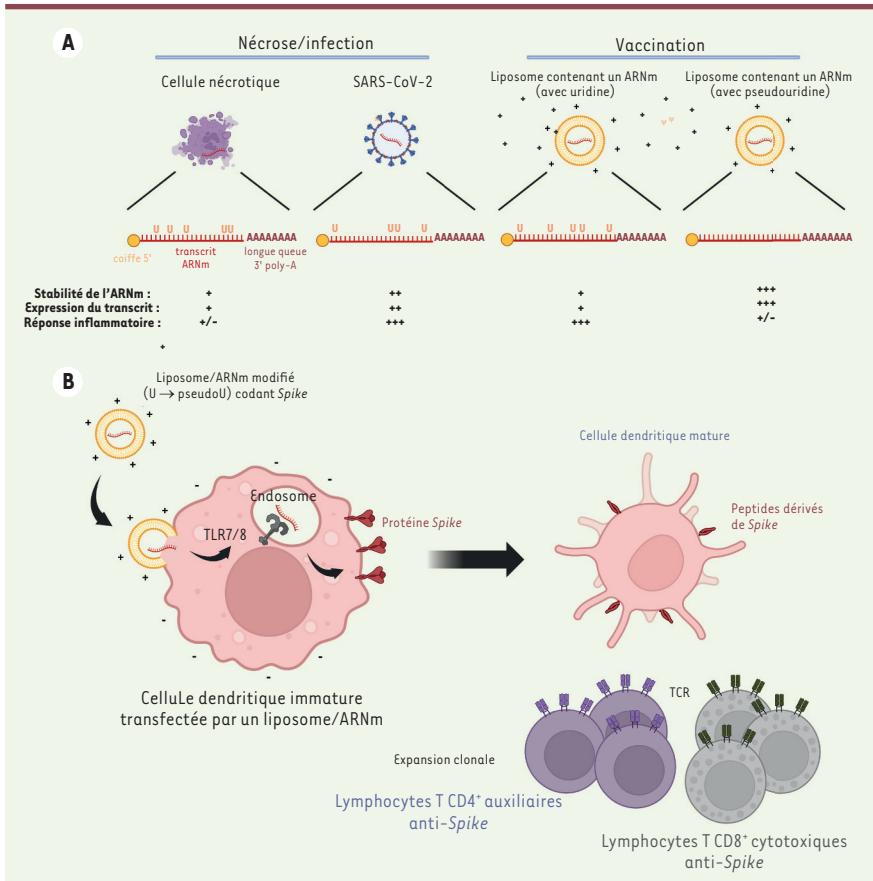


Figure 1. Utilisation d'ARNm modifiés encapsulés dans des liposomes à des fins vaccinales. (A) Les ARNm provenant de cellules eucaryotes nécrotiques sont peu stables, présents en faibles quantités, peu immunogènes et peu inflammatoires, mais capables d'induire la production d'IL-12 et d'IFN- α par les cellules dendritiques [22]. Les ARNm d'origine virale (par exemple des ARNm du SARS-CoV-2) peuvent contenir des pseudouridines (Ψ) à la place d'uridines (U). L'infection par des virus comme le SARS-CoV-2 provoque cependant une réaction inflammatoire qui peut être très sévère chez certains patients. Les travaux de Katalin Karikó et Drew Weissman ont démontré que lorsqu'un ARNm codant une des protéines d'un virus est modifié en introduisant des pseudouridines à la place d'uridines dans sa séquence, puis encapsidé dans un liposome, la production de protéines pro-inflammatoires est diminuée, tandis que sa traduction en protéine est accrue, en raison notamment de sa plus grande stabilité, comparativement au même ARN non modifié contenant seulement des uridines. (B) Des liposomes contenant un ARNm modifié transcrit *in vitro*, contenant

des pseudouridines, codant la protéine *Spike* du SARS-CoV-2, fusionnent avec la membrane de cellules dendritiques immatures. Ils libèrent dans les endosomes l'ARNm modifié simple brin qui se fixe aux TLR7/8 (des ARNm double brin potentiellement encore présents après purification des ARNm simple brin peuvent se lier au TLR3 et donner un signal d'activation [22]). Cela conduit d'une part à une faible réaction inflammatoire du fait de la présence des pseudouridines et, d'autre part, à la maturation des cellules dendritiques, qui deviennent capables d'apprêter la protéine *Spike* traduite en quantités importantes à partir de l'ARN modifié transfecté (du fait de la présence des pseudouridines et de la longueur de la queue poly-A de cet ARNm). Cet apprêtement conduit à la présentation de peptides dérivés de *spike* par des molécules du CMH-I et CMH-II aux lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺, respectivement, et à la prolifération et différenciation de ces lymphocytes en cellules effectrices auxiliaires (qui vont notamment aider à la production d'anticorps neutralisant *Spike*) et cytotoxiques dirigées contre les cellules infectées par le virus. Certaines de ces cellules (lymphocytes T et B) ainsi stimulées vont devenir des cellules mémoires, prêtes à s'activer en cas de nouvelles infections par le virus SARS-CoV-2 ou certains de ses variants. TCR : *T cell receptor* (récepteur T de l'antigène) ; TLR7/8 : récepteurs *Toll-like 7* et *8* (figure créée sur biorender.com).

montrèrent une diminution de leur capacité, voire une incapacité, à produire du TNF- α , une molécule pro-inflammatoire majeure, en fonction du type de modifications des nucléosides et du type de cellules dendritiques testées. Remarquablement, seules les modifications touchant l'uridine (m⁵U correspondant à une méthylation de l'uridine en C5, Ψ correspondant à la pseudouridine⁷, s²U [2-thiouridine]) diminuaient la maturation des cellules dendritiques, ce qui se traduisait par une moindre expression de CD83 et une moindre augmentation de l'expression de CD80 et CD86, et surtout abolissait la production de TNF- α , quel

que soit le type de cellules dendritiques testé, comparativement à des ARNm non modifiés, contenant de l'uridine [1]. Enfin, à l'aide d'élégantes approches de construction d'ARN et de ribonucléotides, Katalin Karikó et Drew Weissman parvinrent à montrer que l'inhibition de l'immuno-stimulation, en termes de production de molécules pro-inflammatoires, provoquée par les ARN, était proportionnelle au nombre de nucléosides modifiés introduits dans les ARN testés, et dépendait également de la longueur de ces derniers. Ils conclurent alors leur article en indiquant que ces données ouvraient la voie au développement de nouveaux ARN thérapeutiques [1], ce qu'ils se mirent à explorer les années suivantes. Katalin Karikó et Drew Weissman vont alors publier les résultats de leurs recherches en 2008 dans un autre article pionnier qui ouvrit définitivement la voie à la mise au point de vaccins à ARN et à leurs tests dans des essais cliniques [27]. Dans cet article, ils montrèrent en effet que l'incorporation de pseudouridine dans

⁷ La pseudouridine est le produit d'une isomérisation de l'uridine, résultat d'une rotation de 180° du cycle pyrimidine autour de l'axe passant par les atomes N3 et C6 du cycle.



des ARNm complexés avec la Lipofectine™, un nucléoside trouvé dans la plupart des ARN [28], améliorait fortement la stabilité et la capacité traductionnelle de ces ARN modifiés⁸, mais que cette incorporation n'induisait pas de réaction inflammatoire significative car n'induisant pas ou très peu la production de TNF- α et d'IFN- α par les cellules spléniques, contrairement aux ARNm non modifiés [27]. Cet article montrait également que le format d'ARNm modifié le plus efficacement traduit était celui présentant une longue queue poly-A et sans formation d'une coiffe [27] et que la plus forte traduction des ARNm modifiés était indépendante de l'activité d'une molécule, RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-1*). Cette dernière détecte les ARN de microorganismes pathogènes, une détection à l'origine d'une production des IFN de type I, les IFN- α et IFN- β . D'autres analyses effectuées ultérieurement par les deux futurs prix Nobel montrèrent de plus que cette forte traduction des ARN modifiés était liée au fait que les pseudouridines⁹ incorporées activaient plus faiblement que l'uridine une protéine kinase (PKR, *RNA-dependent protein kinase*) qui phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF-2 α , ce qui inhibe alors la traduction [29].

Ainsi toutes les connaissances scientifiques étaient désormais réunies pour fabriquer et tester des vaccins à ARNm en utilisant des ARN modifiés encapsulés dans des liposomes (appelés dans la formulation des vaccins « nanoparticules lipidiques » [ou *lipid nanoparticles*, LNP]), capables de stimuler des cellules dendritiques responsables de la mise en place d'une immunité adaptative (productions de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre des cellules infectées par un virus, production d'anticorps anti-virus par des lymphocytes B différenciés en plasmocytes), sans induire une inflammation indésirable (Figure 1), comme Katalin Karikó et Drew Weissman l'avaient indiqué [27]. La voie était ouverte à la conception et au développement très rapides de vaccins de ce type contre le SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), en utilisant un ARNm modifié codant la protéine Spike, la protéine responsable de la fixation du virus aux cellules et de leur infection ! \diamond

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2023: Katalin Karikó and Drew Weissman - A vaccine revolution driven by fundamental research in immunology and molecular biology

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors : the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 2005 ; 23 : 165-75.
2. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* 1993 ; 23 : 1719-22.
3. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990 ; 247 : 1465-8.
4. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med* 1973 ; 137 : 1142-62.

⁸ Ils le démontrèrent d'abord *in vitro* en utilisant des cellules de la lignée HEK293, puis des cellules dendritiques humaines et murines fraîchement isolées, et *in vivo* chez la souris en utilisant un ARNm codant la luciférase.

⁹ Il a été montré que la N¹-méthylpseudouridine décroît la stimulation de l'immunité innée encore plus fortement que la pseudouridine, et accroît de plus la stabilité de l'ARNm ainsi modifié.

5. Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 1985 ; 161 : 526-46.
6. Lee B, Sharron M, Montaner LJ, et al. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 ; 96 : 5215-20.
7. Weissman D, Fauci AS. Role of dendritic cells in immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1997 ; 10 : 358-67.
8. Rubbert A, Combadière C, Ostrowski M, et al. Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J Immunol* 1998 ; 160 : 3933-41.
9. Karikó K, Kuo A, Barnathan ES, Langer DJ. Phosphate-enhanced transfection of cationic lipid-complexed mRNA and plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta* 1998 ; 1369 : 320-34.
10. Karikó K, Kuo A, Barnathan E. Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following administration of the in vitro transcribed encoding mRNA. *Gene Ther* 1999 ; 6 : 1092-100.
11. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 ; 86 : 6077-81.
12. Karikó K, Keller JM, Harris VA, et al. In vivo protein expression from mRNA delivered into adult rat brain. *J Neurosci Methods* 2001 ; 105 : 77-86.
13. Karikó K, Ludwig J. n-Decyl-NHpppA2'p5'A2'p5'A A phosphatase-resistant, active pppA2'p5'A2'p5'A analog. *Biochem Biophys Res Commun* 1985 ; 128 : 695-8.
14. Weissman D, Ni H, Scales D, et al. HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. *J Immunol* 2000 ; 165 : 4710-7.
15. Ni H, Capodici J, Cannon G, et al. Extracellular mRNA induces dendritic cell activation by stimulating tumor necrosis factor- α secretion and signaling through a nucleotide receptor. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 12689-96.
16. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001 ; 413 : 732-8.
17. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice : Mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998 ; 282 : 2085-8.
18. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996 ; 86 : 973-83.
19. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002 ; 270 : 81-92.
20. Vabulas RM, Wagner H, Schild H. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002 ; 270 : 169-84.
21. Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors : implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 2002 ; 23 : 509-12.
22. Karikó K, Ni H, Capodici J, et al. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 12542-50.
23. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000 ; 408 : 740-5.
24. Koski GK, Karikó K, Xu S, et al. Cutting edge : innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells. *J Immunol* 2004 ; 172 : 3989-93.
25. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004 ; 303 : 1529-31.
26. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004 ; 303 : 1526-9.
27. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther* 2008 ; 16 : 1833-40.
28. Bokar JA, Rottman FM. Biosynthesis and functions of modified nucleosides in eukaryotic mRNA. In : Grosjean H, Benne R (eds). *Modification and Editing of RNA*. Washington, DC : ASM, 1998 ; pp. 183-200.
29. Anderson BR, Muramatsu H, Nallagatla SR, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res* 2010 ; 38 : 5884-92.
30. Zitvogel L, Amigorena S, Teillaud JL. À propos de Ralph M. Steinman et des cellules dendritiques. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 11 : 1028-34.
31. Imler JL, Ferrandon D. Le printemps de l'immunité innée couronné à Stockholm. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 1019-24.

TIRÉS À PART

J.-L. Teillaud