



HAL
open science

Les aptamères, de nouveaux outils pour l'étude et la détection d'*Anaplasma phagocytophilum*, une bactérie zoonotique intracellulaire stricte

Lisa Le Dortz

► To cite this version:

Lisa Le Dortz. Les aptamères, de nouveaux outils pour l'étude et la détection d'*Anaplasma phagocytophilum*, une bactérie zoonotique intracellulaire stricte. Médecine humaine et pathologie. AgroParis-Tech, 2023. Français. NNT : 2023AGPT0010 . tel-04842242

HAL Id: tel-04842242

<https://pastel.hal.science/tel-04842242v1>

Submitted on 17 Dec 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

Docteur d'AgroParisTech

Spécialité : Microbiologie

École doctorale n°581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Lisa LE DORTZ

**Les aptamères, de nouveaux outils pour l'étude
et la détection d'*Anaplasma phagocytophilum*,
une bactérie zoonotique intracellulaire stricte**

Directeur de thèse : **Henri-Jean BOULOUIS**

Co-directrice de thèse : **Nadia HADDAD**

Co-encadrants de thèse : **Anne-Claire LAGREE & Pierre DESHUIILLERS**

Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort, le 16 octobre 2023

Membres du jury avec voix délibérative

Françoise BOTTEREL-CHARTIER, Professeure, Hôpital Henri Mondor

Nathalie BOULANGER, Professeure, Université de Strasbourg

Marcel HOLLENSTEIN, Chercheur (HDR), Institut Pasteur

Stéphane BERTAGNOLI, Professeur, ENVT

Pierre-Edouard FOURNIER, Professeur, IHU Marseille

Présidente

Rapporteur & Examinatrice

Rapporteur & Examineur

Examineur

Examineur

Frédéric DUCONGE, Chercheur, CEA

Invité

Pour Lucas, merci pour ton soutien indéfectible

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord **les membres de mon jury de thèse** qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mes travaux. Merci au Pr Nathalie Boulanger et au Dr Marcel Hollenstein qui ont accepté d'en être les rapporteurs. Merci également au Pr Stéphane Bertagnoli, Pr Françoise Botterel-Chartier et au Pr Pierre-Edouard Fournier.

Je voudrais remercier sincèrement **mes encadrants de thèse**, pour votre accompagnement tout au long de cette aventure. Merci pour votre implication et vos conseils. Vous avez tous été très complémentaires. Un grand merci pour votre confiance et de m'avoir permis de m'épanouir autant dans ce projet. Je ressors grandie de cette expérience et c'est en grande partie grâce à vous.

Merci Nadia, pour votre profond soutien et votre implication. Vous avez toujours été disponible et à l'écoute, malgré votre emploi du temps très chargé. J'ai beaucoup appris à vos côtés, que ce soit scientifiquement et humainement. Merci d'avoir été présente dans les bons moments et de votre soutien dans les situations plus difficiles. Vous avez su me rassurer et m'apaiser à plusieurs reprises pendant ces trois années de thèse. Vous êtes un vrai puits de savoir et vous avez grandement contribué à la réussite de ce projet. Je vous en serai toujours reconnaissante.

Merci Henri-Jean, pour votre partage de connaissances et votre confiance. Vous avez toujours su apporter un regard scientifique extérieur sur ce projet. Merci également pour votre humour, toujours apprécié en réunion VAMP. Profitez de votre repos si bien mérité !

Merci Anne-Claire, pour ta bienveillance et pour les connaissances que tu m'as apportées en bactériologie. Je te souhaite de réussir dans tes projets professionnels et personnels.

Merci Pierre, pour ton implication et tes retours pertinents tout au long de ce projet. Tu m'as permis d'approfondir mes travaux et de mûrir dans mon raisonnement scientifique. Je te souhaite également beaucoup de réussite.

Je remercie le directeur du Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES, Dr **Pascal Boireau** pour m'avoir accueillie au sein de son établissement. Je remercie également **Sara Moutailler** (DU de l'UMR BIPAR) pour l'accueil dans son unité. Tu as toujours trouvé du temps pour répondre à mes questions scientifiques et administratives. Merci pour tous tes conseils.

Je souhaite remercier les **financeurs de ma thèse**, l'école doctorale ABIES et également AgroParisTech, l'Académie Française (Jean Walter Zellidja) et l'association MedVetNet pour m'avoir permis de réaliser trois mois de thèse à l'étranger.

Pour mener à bien ce projet, des collaborations nationales et internationales ont été mises en place. Je tiens donc à remercier nos collaborateurs.

Je voudrais remercier sincèrement Dr **Frédéric Ducongé** (CEA), membre de mon comité de pilotage. Merci pour votre aide considérable dans ce projet. J'ai découvert le monde des aptamères grâce à vous et j'ai beaucoup appris à vos côtés. Merci d'avoir toujours été

disponible pour répondre à mes (très nombreuses) questions et d'avoir été un vrai soutien dans ce projet. Je n'aurais jamais réussi sans votre aide.

Je remercie également les autres membres de mon comité de thèse, Pr **Benoît Jaulhac** et Pr **Florence Fenollar**. Merci pour vos conseils avisés et nos échanges. Merci également au Dr **Grégory Caignard**, référent ABIES pour ta bienveillance et ton soutien à mon égard.

Merci également au Pr **Gunter Mayer**, pour m'avoir accueillie trois mois dans son laboratoire à l'Université de Bonn. Merci à **Stefan Breuers**, pour votre aide pour la plateforme robotisée. Ces trois mois en Allemagne m'ont également permis d'échanger avec d'autres doctorants. Merci à eux de m'avoir fait découvrir leur ville et leur culture.

Je souhaite remercier également tous les membres du **COMERC** et plus particulièrement Pr. Caroline Gilbert pour m'avoir accordé sa confiance. J'ai beaucoup appris à vos côtés et notamment à développer mon esprit critique. Ces réunions mensuelles vont me manquer.

J'ai bénéficié pendant ces trois ans, d'un environnement de travail sain, bienveillant et chaleureux. J'ai eu l'opportunité de rencontrer beaucoup de personnes et de créer de vrais liens. Tout d'abord, un très grand merci à l'ensemble des membres du groupe VAMP. Merci à **Christelle** et **Corinne**, pour votre gentillesse et disponibilité. Merci aux stagiaires : **Quentin**, **Benjamin**, **Marion** et **Arthur**. Cela a été un vrai plaisir de vous encadrer et de voir également votre évolution dans le monde professionnel. Bravo Benjamin pour ta thèse à Pasteur !

Un grand merci à **Clotilde**, ma Cloclo ou mon binôme. Merci pour ta joie de vivre, ton rire communicatif, ton optimisme. Tu as toujours été là pour moi, jusqu'à la fin (même lors de l'impression de ce manuscrit). Je me rends compte de la chance que j'ai eu de te rencontrer et tu feras partie de mes meilleurs souvenirs. Tu es quelqu'un d'extraordinaire, je ne veux plus que tu en doutes et je suis très fière d'avoir pu observer ton évolution. Tu m'as suivie même en Roumanie ! Je te l'ai déjà dit mais ton soutien m'a permis de tenir bon même dans les moments les plus difficiles. Je te souhaite de réussir dans tes projets, ce dont je ne doute pas.

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes du **bâtiment Carré** où il y règne une atmosphère familiale et chaleureuse. On le sait, les anciens reviennent toujours boire un café ! Merci à mes co-doctorantes de bureau Caina et Stefania, je vous apporte plein de courage pour votre dernière année. Merci également à Lourdes et Apolline pour votre joie de vivre ! Merci à Ladislav pour ta bienveillance et pour m'avoir formée au microscope confocal. Je garde un très bon souvenir de notre retour de Roumanie. Merci Odile pour ton humour et pour nous avoir toujours servis en fournitures. Merci à Angélique, pour ta gentillesse et nos discussions. Merci à Clémence, pour ta douceur et ton sens de l'organisation.

Un merci particulier à **Sabine** pour ton soutien et tous nos fous rires. Tu as été au petit soin avec moi, merci pour les chocolats et les petits cadeaux posés sur mon bureau. Je suis très heureuse de t'avoir rencontrée.

Merci à **Myriam** (Mimi), quel bonheur de t'avoir accueillie au sein de Carré ! Nos petites pauses café, nos fous rires et nos apéros mojitos vont me manquer. Je te souhaite le meilleur pour la suite. Merci également à **Denis** pour tous tes conseils. Quand je pense qu'on a enfin pu fêter le départ de la photocopieuse !

Un très grand merci à **Aurélie** (ma pépète). Les mots ne sont pas suffisants pour t'exprimer ma gratitude. Merci pour tous tes conseils, tes attentions et ton énergie. Tu as été d'un grand

soutien cette dernière année, une vraie petite maman ! Tu es quelqu'un de formidable. Nos petits déjeuners et nos gouters vont beaucoup me manquer mais j'ai ma revanche à prendre aux fléchettes !

Je voudrais remercier l'ensemble des membres de **l'équipe Paralim**. Merci Aurélie C. pour être une vraie référence au laboratoire. Merci Laura-Lucia pour nous apporter un peu de soleil colombien. Merci à Amandine, Marie M., Isabelle pour votre gentillesse. Merci à ma petite Najat ! On devait forcément se rencontrer. Nos discussions et fous rires en culture cellulaire vont me manquer et merci encore pour ton soutien ! Merci à Dany et Madeleine, sans qui le laboratoire ne fonctionnerait pas. Merci à Sophie H, pour ton aide dans toutes mes démarches administratives. Merci également à Momo pour ta joie de vivre et ton rire communicatif (on s'en souviendra de tes crêpes). Merci aussi à Delphine et Radu pour avoir partagé ensemble de bons moments. Merci à Alain et Océane, nos animaliers préférés !

Un merci particulier à ma **Sandra**. C'est difficile de trouver les mots. Tu es devenue plus qu'une collègue, une vraie amie sur qui je peux compter. Nos fous rires, nos discussions sérieuses (ou pas), nos sorties en dehors du laboratoire et surtout ton passage quotidien par ma fenêtre de mon bureau chaque soir vont terriblement me manquer. Merci d'être tout simplement toi, tu es quelqu'un de formidable.

Un grand merci à mes acolytes du **Ginger Gang** (Camille, Filip et Noah) !! Vous faites parties de mes plus beaux souvenirs et de mes plus fous road-trips (Normandie et Pays-Bas). Merci Filip d'avoir été un vrai coach sportif, c'est vraiment grâce à toi qu'on a réussi à courir le semi-marathon. J'ai hâte de planifier le prochain voyage du GG en République Tchèque ! Je te souhaite beaucoup de bonheur avec Pavlina. Merci Noah, ou aussi mon binôme aptamère. On a quand même bien rigolé et surtout on a réussi après des mois de travail... à générer de l'ADN simple brin !! Que de bons souvenirs à tes côtés. Merci d'être toi, un vrai électron libre.

Enfin, merci à ma **Camille**. J'ai du mal à trouver les mots pour te dire à quel point tu comptes pour moi. Tu as été une vraie grande sœur, une meilleure amie toujours à veiller sur moi. Tout le monde est d'accord, tu es quelqu'un d'exceptionnel. Je suis très fière de toi, de te voir t'épanouir et devenir une vraie « business woman » ! Tu as été un vrai pilier, un exemple tout au long de cette aventure. Grâce à toi, j'ai réussi à me surpasser notamment lors du semi-marathon, qu'on a préparé en seulement deux mois. Merci pour tout. Je t'aime fort.

Merci à **Baptiste D.** pour ces supers moments à Carré quand tu venais nous voir de Corse. Encore bravo pour ta thèse et merci pour toutes nos discussions et tes conseils. Grâce à toi, je ne me laisserai plus avoir au « Chapeau maison, qui fait le café pour tout le monde » !

Merci à **Stacy**, pour nos discussions folles et nos réunions scientifiques devant le cytomètre en flux. Je suis super contente de te compter comme amie. Merci pour tous tes conseils, ton énorme soutien et nos fous rires. Je te souhaite pleins de bonheurs avec Meredith et je suis sûre que tu vas avoir une très grande carrière scientifique.

Merci également à **Clémence N.** pour être devenue une vraie amie. Je me souviens encore de nos fous rires et nos discussions déjantées en Roumanie. Ta force est un vrai exemple pour moi. On se revoit en septembre à notre QG !

Je souhaite également remercier **toutes les autres personnes** que j'ai pu rencontrer sur le campus. Merci à Sandra BB., c'est grâce à vous que j'ai pu réaliser cette thèse, merci

infiniment pour votre aide. Merci à Jennifer M. (Sepic) pour ta douceur et nos discussions devant le BCG. Merci à Sandrine (Virologie) pour ton soutien et ton humour. Je suis très contente d'avoir fait ta connaissance. Merci à Tehei (Virologie), pour être un vrai petit soleil. Merci à Lisa F. et Mai Lan pour nos discussions et votre soutien.

Merci à mes meilleures amies d'enfance, **Claire et Céline**. Nos sorties sur Paris, dans les musées, aux guinguettes ou en bord de Seine ont été de vraies bouffées d'air frais dans mon quotidien. Merci pour votre amitié infailible depuis toutes ces années et de votre soutien. Je suis très fière de vous, de vos parcours et surtout de grandir à vos côtés. J'ai hâte de voir ce que l'avenir nous réserve. Je vous aime fort.

Merci aussi à ma **Judith**. Quel bonheur d'avoir pu te rencontrer à Sanofi ! Même si géographiquement on est loin l'une de l'autre, j'ai toujours cette sensation d'être connectée à toi. Merci d'être toi et la soutenance sera l'occasion de se revoir !

Je remercie **ma famille** de tout mon cœur, de m'avoir tant soutenu toutes ces années. Merci Papa et Maman, pour votre amour et pour avoir toujours cru en moi. Vous m'avez donné toutes les cartes pour réussir et je ne vous en remercierai jamais assez. Merci aussi pour la Bretagne, qui nous permet de nous sentir encore plus proche de nos racines familiales, et pour l'adoption d'Orion ! Merci à mes petites sœurs, Clarisse et Eloïse. Merci pour votre énergie positive et pour m'avoir toujours soutenue. Je suis si fière de vous. Vous m'avez apporté toutes les deux de la force pour me battre. Merci à mes quatre grands parents pour votre soutien et votre éternel amour. Merci Papi G., tu es un vrai guerrier. Merci à mes grand-mères pour votre douceur ainsi que votre générosité. A mon Papi breton et à ma marraine corse, que j'aurai aimé avoir à mes côtés. Vous me manquez mais je sais que vous me protégez. Merci à mon oncle Olivier pour ton soutien et ton intérêt pour ma thèse.

Merci à **ma belle-famille** pour m'avoir si bien accueillie. Je suis si heureuse de voir que la famille s'agrandit, avec le petit Matéo !

Enfin, un dernier remerciement mais pas le moindre, à celui qui partage ma vie depuis maintenant plusieurs années, **Lucas**. Merci pour tout. Merci pour ton soutien indéfectible au quotidien, pour toutes tes attentions et d'avoir su me reconforter, toujours avec une touche d'humour. Tu as vraiment vécu cette thèse jusqu'au bout avec moi et tu as dû supporter mes moments de folie et de craquage (je chante très bien – non vraiment pas). Notre couple a grandi en même temps que cette expérience. Tu es ma force au quotidien et j'ai cette sensation qu'avec toi, je peux gravir des montagnes. Je t'aime.

Sommaire

Remerciements.....	5
Sommaire	9
Liste des abréviations	13
Liste des figures.....	17
Liste des tableaux	19
Introduction générale	20
Etude bibliographique	22
Chapitre 1 : <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , enjeu et problématique	23
I. Une classification remise en cause	23
I.A. Classification actuelle	23
I.B. Histoire et évolution taxonomique	24
II. L'anaplasmose granulocytaire, une ou plusieurs maladies ?.....	26
II.A. L'anaplasmose granulocytaire humaine (AGH).....	26
II.B. L'anaplasmose granulocytaire des ruminants domestiques.....	28
II.C. L'anaplasmose granulocytaire chez les autres espèces domestiques	29
II.D. Diagnostic de l'anaplasmose granulocytaire et dépistage de l'infection	30
II.D.1. Méthodes directes	30
II.D.2. Méthodes indirectes	31
II.E. Traitement et prophylaxie	32
III. Des cycles épidémiologiques complexes.....	34
III.A. Les vecteurs.....	35
III.B. Les hôtes vertébrés.....	37
III.C. Les cycles épidémiologiques	38
III.C.1. Aux Etats-Unis.....	38
III.C.2. En Europe	39
IV. Des mécanismes d'interactions cellulaires et moléculaires à explorer.....	42
IV.A. Cycle de développement intracellulaire	43
IV.B. Mécanismes cellulaires et moléculaires identifiés chez les hôtes vertébrés	44
IV.B.1. Adhésion et internalisation au sein de la cellule hôte vertébrée	44
IV.B.2. Multiplication au sein de la cellule hôte vertébrée	45
IV.B.3. Mécanismes de survie.....	47
IV.C. Mécanismes cellulaires et moléculaires identifiés chez les hôtes invertébrés.....	49
V. Problématique	53
V.A. Des modèles cellulaires limitées.....	54

V.A.1. Les cellules HL-60.....	54
V.A.2. Les cellules de tiques.....	55
V.A.3. Les cellules endothéliales.....	56
V.B. Des outils moléculaires manquants.....	56
Chapitre 2 : Les aptamères, des ligands novateurs et prometteurs.....	58
I. Histoire et évolution.....	58
I.A. Découverte.....	58
I.B. Evolution.....	59
I.C. Structure des aptamères.....	59
II. La méthode de sélection des aptamères dénommée SELEX.....	61
II.A. Le principe du SELEX traditionnel.....	61
II.B. Les principales variantes du SELEX.....	62
II.B.1. SELEX contre des protéines ou autres molécules purifiées.....	62
II.B.2. Cell-SELEX.....	64
II.B.3. SELEX <i>in vivo</i>	65
II.C. Les étapes clés du SELEX.....	65
II.C.1. La librairie initiale.....	65
II.C.2. Les conditions de sélection.....	66
II.C.3. L'augmentation de la pression de sélection.....	67
II.C.4. L'amplification par PCR.....	68
II.C.5. La génération d'ADN simple brin.....	68
II.D. Suivi de l'évolution du SELEX.....	69
II.E. Identification des séquences.....	70
II.F. Caractérisation des candidats aptamères.....	70
II.F.1. Notion d'affinité.....	71
II.F.2. Les différentes méthodes de mesure de l'affinité.....	72
II.F.3. Notion de spécificité.....	74
III. Les forces et les faiblesses des aptamères.....	74
III.A. Comparaison avec les anticorps monoclonaux.....	74
III.B. Limites des aptamères.....	77
III.C. Modification des aptamères.....	78
IV. Les principales applications des aptamères.....	80
IV.A. Les aptasensors et leurs applications en diagnostic.....	80
IV.A.1. Les aptasensors.....	81
IV.A.1.i. Les différentes configurations.....	81
IV.A.1.ii. Une multiplicité de transducteurs.....	82
IV.A.2. Quelques exemples d'applications.....	83
IV.A.2.i. Bactéries.....	83

IV.A.2.ii. Virus	84
IV.A.2.iii. Parasites.....	85
IV.A.2.iv. Tumeurs	85
IV.B. Les aptamères, des outils thérapeutiques	86
IV.B.1. Les aptamères, des molécules thérapeutiques	86
IV.B.2. Les aptamères, des systèmes de délivrance des médicaments	87
IV.C. Les aptamères en imagerie <i>in vivo</i>	88
V. Leurs applications actuelles et potentielles aux maladies transmissibles par les tiques...89	
Revue : Tick-borne diseases in Europe : current control and prevention tools and the promise of aptamers.....	89
Objectifs de la thèse.....	100
Etude expérimentale	102
Chapitre 1 : Sélection d'aptamères contre une suspension enrichie en <i>A. phagocytophilum</i>	103
I. Optimisation du protocole de sélection d'aptamères	103
I.A. Introduction et objectifs.....	103
Article : Optimized lambda exonuclease digestion or purification using streptavidin-coated beads: which one is best for successful DNA aptamer selection?.....	106
I.B. Discussion et conclusion	107
II. Sélection d'aptamères contre une suspension enrichie en <i>A. phagocytophilum</i>	110
II.A. Introduction et objectifs.....	110
Article : Aptamer selection against cell extracts containing the zoonotic obligate intracellular bacterium, <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	110
II.B. Discussion et conclusion	143
III. Résultats préliminaires des essais portant sur des applications futures des aptamères sélectionnés	149
III.A. Introduction et objectifs.....	149
III.B. Matériel et méthodes	150
III.B.1. Cellules et purification d' <i>A. phagocytophilum</i>	150
III.B.2. Purification des cibles	150
III.B.3. Tests de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> des aptamères	152
III.B.4. Méthode de capture d' <i>A. phagocytophilum in vitro</i>	153
III.C. Résultats.....	154
III.C.1. Purification des cibles.....	154
III.C.2. Tests de l'activité antibactérienne des aptamères <i>in vitro</i>	155
III.C.3. Méthode de capture d' <i>A. phagocytophilum in vitro</i>	156
III.D. Discussion et conclusion	158
Chapitre 2 : Sélection d'aptamères contre Asp14, une protéine de surface d' <i>A. phagocytophilum</i>	158

I.	Introduction et objectifs	163
Article :	Selection of DNA aptamers against Asp14, a surface protein of <i>A. phagocytophilum</i>	163
II.	Discussion et conclusion	197
	Discussion générale et perspectives	204
	Conclusion	217
	Références	219
	Annexes	243
	Publications scientifiques.....	243
	Communications scientifiques dans des congrès	243
	Encadrements de stagiaires	244
	Financements	244

Liste des abréviations

A

ADN : Acide désoxyribonucléique
AGB : Anaplasmose granulocytaire bovine
AGH : Anaplasmose granulocytaire humaine
AipA : *A. phagocytophilum invasion protein A*
AnkA : Protéine A riche en ankyrine
APS : Antigène spécifique de la prostate
AptA : *Anaplasma phagocytophilum* toxin A
ARN : Acide ribonucléique
ARNr : ARN ribosomal
ARNt : ARN de transfert
Asp14 : *14-kDa A. phagocytophilum surface protein*
ATCC : *American Type Culture Collection*
ATPase : Adénosine triphosphatase
Ats-1 : Substrat 1 transloqué par *A. phagocytophilum* (*Anaplasma translocated substrate-1*)

B

bcl-2 : Lymphome à cellules B-2 (*B-cell lymphoma-2*)
BSA : Albumine de sérum bovin (*bovine serum albumin*)

C

CCHFV : *Crimean Congo Hemorrhagic Fever virus*
CDC : *Centers for disease control and prevention*
CEA : Commissariat à l'énergie atomique
CE-SELEX : *Capillary Electrophoresis SELEX*
CHIKV : *Chikungunya virus*
CMFDA : *5-chloromethylfluorescein diacetate*
Cy5 : Cyanine 5

D

Da : Dalton
DAPI : Dichlorhydrate de Diamidino-4',6-phénylindole-2
DC : Forme dense (*dense-cored cell*)
DENV : Virus de la Dengue
DMSO : Dimethyl sulfoxide
dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

E

ELASA : *Aptamer-based ELISA*
ELISA : *Enzyme linked immunosorbent assay*
ELONA : *Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay*
EnvA : Ecole nationale vétérinaire d'Alfort

F

FACS : *Fluorescence activated cell sorting*
FAM : *Fluorescein Amidite*
FDA : *Food-Drug Administration*
FITC : *Isothiocyanate de fluorescéin (fluorescein isothiocyanate)*
FLOT1/FLOT2 : *Flotillines 1/2*

G

GPI : *Glycosylphosphatidylinositol*
GST : *Glutathion-S-transferase*

H

HGA : *Human granulocytic anaplasmosis*
HGE : *Ehrlichiose granulocytaire humaine (human granulocytic ehrlichiosis)*
HL-60 : *Human promyelocytic leukemia cells*
HL-60 NY18 : *Cellules HL-60 infectées par la souche NY18 d'A. phagocytophilum*
HRP : *Horseradish peroxidase*
HSP : *Protéine de choc thermique (heat shock protein)*
HTS-SELEX : *High-throughput sequencing SELEX*

I

IAFGP : *Ixodes tick antifreeze glycoprotein*
IFA : *Immunofluorescence indirecte (immunofluorescence assay)*
IgG : *Immunoglobuline G*
IgM : *Immunoglobuline M*
IL : *Interleukine*
IMDM : *Milieu modifié de Dulbecco de Iscove (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)*
IRM : *Imagerie par résonance magnétique*
ISE6 : *Cellules de tiques d'I. scapularis*
ISE6 NY18 : *Cellules de tiques ISE6 infectées par la souche NY18 d'A. phagocytophilum*
ISE7 NV20s : *Cellules de tiques ISE6 infectées par la souche NV20s d'A. phagocytophilum*
ITC : *Calorimétrie de titrage isotherme (Isothermal titration calorimetry)*

K

K_d : *Constante de dissociation*

L

LDL : *Lipoprotéines de basse densité (low density lipoproteins)*
LC3 : *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*
LOD : *Limit of detection*
LPS : *Lipopolysaccharides*

M

Mag-SELEX : *Magnetic bead-based SELEX*
miARN : *MicroARN*
MIRGen : *Molecular Imaging Research Center*
MLST : *MultiLocus sequencing typing*
MLVA : *Multiple Locus Variable number tandem repeat Analysis*
M-SELEX : *Microfluidic SELEX*

MSP : *Major surface protein*
MUC-1 : *Mucine-1 humaine*

N

NADPH : *Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*
NCBI : *National Center for Biotechnology Information*
NCP1 : *Niemann-Pick type C1*
NGS : *Next-Generation Sequencing*
NV2Os : *Norway variant 2 ovine strain*

O

OMP : *Protéine de membrane externe (outer membrane protein)*
OspA : *Outer surface protein A*

P

PBS : *Solution saline tamponnée en phosphate (phosphate buffer saline)*
PCC : *Pearson correlation coefficient*
PCR : *Réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)*
PDI : *Protéine disulfure isomérase*
PEG : *Polyéthylène glycol*
pH : *Potentiel hydrogène*
PSGL-1 : *P-selectin glycoprotein ligand 1*

Q

qPCR : *PCR quantitative (quantitative PCR)*

R

RC : *Forme réticulée (reticulate cell)*
ROS : *Espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)*
RT-PCR : *Réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse (reverse-transcriptase polymerase chain reaction)*

S

SARS-CoV-2 : *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*
SDS PAGE : *Dodécyl Sulfate de Sodium Polyacrylamide gel electrophoresis*
SELEX : *Systematic Evolution of EXponential Enrichment*
siARN : *Petit ARN interférent (small interfering RNA)*
SL : *Starting library*
SOMAmers : *Slow off-rate modified aptamers*
SPR : *Résonance plasmonique de surface (Surface Plasmon Resonance)*
ssDNA : *Single stranded DNA*
SVF : *sérum de vœu fœtal*

T

T4SS : *Protéine effectrice du système de sécrétion de type 4*
TAR : *Transactivation response*
TAR : *Transactivateur of transcription*
TBD : *Tick-borne diseases*
TBEV : *Virus de l'encéphalite à tiques (Tick-Borne Encephalitis Virus)*

TBF : *Tick-borne Fever*
TBP: *Tick-borne pathogens*
TIDD : *Target-induced dissociation/displacement*
TISS : *Target-induced structure switching*
TLR : Récepteurs transmembranaires Toll-like (Toll-like receptors)
TNF- α : *Tumor necrosis factor α*
TSAW : *Traveling surface acoustic wave*

U

USA : Etats-Unis d'Amérique (*United States of America*)

V

VAMP : Vecteurs et Agents Microbiens Pathogènes
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
VHC : Virus de l'hépatite C
VIH : Virus de l'immunodéficience Humaine
vRNPs: *Viral ribonucleoproteins*

W

WNV : *West-Nile virus*

Z

ZIKV : *Zika virus*

Liste des figures

Figure 1 Arbre phylogénétique des Anaplasmataceae basé sur l'ARNr 16S (Inokuma et al., 2001a).....	24
Figure 2 Nombre de cas d'anaplasmose granulocytaire humaine rapportés par an aux Etats-Unis, entre 2000 et 2019 (CDC, 2022).	26
Figure 3 Neutrophiles infectés par <i>A. phagocytophilum</i> (flèches) chez un chien, observés sur un frottis sanguin après coloration différentielle (UMR BIPAR, 2023).	30
Figure 4 Répartition géographique des tiques dures du genre <i>Ixodes</i> dans le monde (Stuen, 2007).	35
Figure 5 Cycle biologique d' <i>I. ricinus</i> (Herrmann and Gern, 2015).	36
Figure 6 Cycles épidémiologiques supposés d' <i>A. phagocytophilum</i> aux Etats-Unis. Une flèche bleue représente une transmission prouvée. Une flèche grise représente une transmission possible. Illustration adaptée de Dugat, 2014.	38
Figure 7 Cycles épidémiologiques supposés d' <i>A. phagocytophilum</i> en Europe, adaptée de Dugat, 2014. Une flèche verte représente une transmission très probable. Une flèche grise représente une transmission dont la probabilité est plus faible.	40
Figure 8 Cycle de développement intracellulaire d' <i>A. phagocytophilum</i> au sein des cellules de vertébrés (Pruneau et al., 2014).	43
Figure 9 Multiplication d' <i>A. phagocytophilum</i> au sein des vacuoles cytoplasmiques de la cellule hôte vertébrée (Rikihisa, 2011).	46
Figure 10 Mécanismes moléculaires et cellulaires mis en place par <i>A. phagocytophilum</i> pour assurer sa survie au sein de son vecteur, la tique (Severo et al., 2012).	49
Figure 11 Cellules HL-60 infectées par la souche NY18 d' <i>A. phagocytophilum</i> (à gauche) et cellules de tiques ISE6 infectées par la souche NV2Os d' <i>A. phagocytophilum</i> , après coloration Hémacolor®	54
Figure 12 Evolution du nombre de publications par an sur les aptamères de 1990 à 2022 (Pubmed, 2023).....	59
Figure 13 A: Structures secondaires de type tige-boucle, à savoir le segment simple brin (violet), la tige-boucle en épingle à cheveux (rouge), la boucle interne (vert), la boucle latérale (jaune), le duplex (bleu) et la boucle à plusieurs branches (rose) (Sullivan et al., 2019). B : Structures secondaires G-quadruplexes (ici un G3-quadruplexe) qui peuvent être de type diagonal, latéral, ou hélice (Lightfoot et al., 2019).....	60
Figure 14 Représentation des aptamères et leur interaction avec la molécule cible (Nimjee et al., 2017).	60

Figure 15 Les principales étapes du SELEX, dans le cas d'une sélection d'aptamères à ADN simple brin.....	61
Figure 16 Evolution des courbes d'amplification et de fusion au cours du SELEX (Luo et al., 2017).....	69
Figure 17 Exemple de résultats d'affinité obtenus pour des aptamères sélectionnés contre la fluorescéine (Aljohani et al., 2018). Ces données représentent les courbes de liaison totale du ligand et de la séquence scramble pour la molécule cible.	72
Figure 18 Les principales applications des aptamères.....	80
Figure 19 Les différentes configurations possibles des aptasensors (Prante et al, 2020). ..	81
Figure 20 Représentation schématique de l'aptasensor fluorimétrique pour la détection de <i>S. aureus</i> (Chen et al., 2022).....	83
Figure 21 Représentation schématique de l'aptasensor électrochimique développé pour la détection de deux biomarqueurs du cancer du sein (Zhao et al., 2012).	85
Figure 22 Les principales étapes du SELEX. Les encadrés rouges correspondent aux étapes critiques du protocole.	103
Figure 23 Principes des méthodes de génération d'ADN simple brin pour le SELEX. A: PCR asymétrique, B: Séparation des brins en conditions dénaturantes, C: Capture du brin biotinylé sur des billes magnétiques couplées à de la streptavidine, D: Digestion du brin phosphorylé par la lambda exonucléase.....	104
Figure 24 Principe de la méthode de purification des cibles reconnues par les aptamères, dans le cas où la cible est une protéine de surface d' <i>A. phagocytophilum</i>	151
Figure 25 Principe de la méthode capture d' <i>A. phagocytophilum</i> à partir d'un lysat de cellules HL-60 NY18.	153
Figure 26 Migration des protéines extraites sur gel SDS-PAGE après coloration au Bleu de Coomassie. 1 : marqueur de taille, 2 : BSA, 3 : protéines extraites avec des billes sans aptamère (témoin PBS), 4 : protéines extraites avec le scramble, 5 : protéines extraites avec Apta-F4, 6 : protéines extraites avec Apta-F8, 7 : protéines extraites avec Apta-F10.	154
Figure 27 A. Estimation du pourcentage de cellules infectées par <i>A. phagocytophilum</i> (HL-60 NY18) par observation microscopique après cytocentrifugation et coloration Hémacolor®. B: Représentation du ratio normalisé du gène <i>msh2</i> au cours de l'infection.....	155
Figure 28 Représentation des valeurs moyennes de Ct obtenues pour le gène <i>Aph-msh2</i> après capture sur billes magnétiques couplées à de la streptavidine selon trois concentrations d'aptamères : 2 μ M, 1 μ M et 500 nM.	157

Liste des tableaux

Tableau 1 Liste des protéines identifiées d' <i>A. phagocytophilum</i> , leur localisation, leur rôle identifié ou non et leur présence dans les hôtes vertébrés ou invertébrés.	52
Tableau 2 Liste des souches isolées et cultivées d' <i>A. phagocytophilum</i> , les plus utilisées. Les lignes grisées indiquent les souches actuellement disponibles dans notre laboratoire.....	54
Tableau 3 Principes, avantages et inconvénients des méthodes de séparation les plus utilisées pour mesurer l'affinité des aptamères contre des molécules purifiées (Jing et Bowser, 2011).....	73
Tableau 4 Comparaison des anticorps monoclonaux et des aptamères (Niederlender et al., 2021).....	75
Tableau 5 Résumé des résultats de marquage des aptamères sous différentes conditions et observés par microscopie confocale.....	148
Tableau 6 Amorces et sondes utilisées pour la PCR Taqman®.....	153
Tableau 7 Comparaison et résultats des deux approches pour sélectionner des aptamères contre <i>A. phagocytophilum</i>	216

Introduction générale

Anaplasma phagocytophilum est une bactérie intracellulaire stricte, majoritairement transmise par les tiques dures du genre *Ixodes*, avec un impact clinique et économique majeur sur la santé humaine et animale (Dugat et al., 2015). Cette bactérie est responsable de l'anaplasmose granulocytaire humaine (AGH) et de celle des ruminants domestiques (aussi appelée *Tick-borne Fever*, TBF), et infecte également de nombreux autres mammifères sauvages (comme les rongeurs ou les ruminants sauvages) et domestiques (particulièrement chevaux, chiens, chats). Aux Etats-Unis, l'anaplasmose granulocytaire humaine représente un enjeu de santé publique, avec une incidence en constante augmentation selon le CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) (Matei et al., 2019). Au contraire, les cas d'anaplasmose granulocytaire bovine (AGB), récemment documentés, sont, quant à eux, très rares et asymptomatiques aux Etats-Unis (Hoar et al., 2008; Eleftheriou et al., 2022). En Europe et notamment en France, *A. phagocytophilum* apparaît de plus en plus comme une bactérie d'importance économique majeure. Les nombreux cas d'anaplasmose granulocytaire chez les ruminants domestiques sont à l'origine d'importantes pertes économiques au sein des élevages, en provoquant des avortements, des chutes de production, en particulier des agalaxies (arrêt de la production laitière), voire la mort de certains animaux (Stuen, 2007). Par sa fréquence, elle est considérée comme la deuxième maladie transmissible par les tiques en médecine vétérinaire, en Europe (Chastagner et al., 2015). A l'inverse des Etats-Unis, peu de cas humains sont rapportés en France et en Europe (Matei et al., 2019).

A. phagocytophilum est une bactérie particulièrement difficile à isoler et cultiver en laboratoire. En effet, peu de cellules permissives sont disponibles et aucun modèle de cellules de vertébrés n'existe pour la culture de souches provenant de ruminants. *A. phagocytophilum* infecte majoritairement les granulocytes neutrophiles, qui ont une durée de vie très courte dans la circulation sanguine, estimée à moins de 24h (Bonilla et al., 2020). Pour toutes ces raisons, très peu de souches d'*A. phagocytophilum* parviennent à être isolées et cultivées au laboratoire et peu de génomes ont pu être séquencés dans le monde. En conséquence, de nombreuses interrogations persistent, notamment sur la variabilité des souches, les cycles épidémiologiques, l'identification des espèces réservoirs en Europe et relativement peu de recherches ont pu être réalisées pour comprendre les interactions entre la bactérie et ses hôtes vertébrés/invertébrés. Les outils moléculaires, en particulier les anticorps monoclonaux, susceptibles de permettre d'étudier la bactérie et ses interactions moléculaires dans les modèles cellulaires, sont inexistantes ou actuellement indisponibles. Ce manque d'outils et les

lacunes en termes de connaissances rendent ainsi difficiles la mise en place d'outils d'investigation et de lutte, notamment diagnostiques et thérapeutiques.

Les aptamères sont des outils innovants et représentent une bonne alternative aux anticorps monoclonaux. Ces oligonucléotides sont en effet capables de se lier avec une grande affinité et une grande spécificité à un large éventail de cibles (Zhuo et al., 2017). Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse était de sélectionner des aptamères dirigés contre *A. phagocytophilum* ou des molécules exprimées durant l'infection, à des fins de recherche et de diagnostic. Pour répondre à cet objectif, deux approches ont été développées. La première approche consistait à sélectionner des aptamères contre une suspension enrichie en *A. phagocytophilum*. La seconde approche avait pour objectif de sélectionner des aptamères contre une protéine de surface d'*A. phagocytophilum*, Asp14.

Pour rendre compte de ces objectifs, le manuscrit est présenté comme suit : l'état de l'art permet de faire le point sur les connaissances actuelles relatives à *A. phagocytophilum*, en mettant l'accent sur leurs limites et les difficultés méthodologiques et techniques rencontrées. Les aptamères sont ensuite présentés, en soulignant leurs avantages et leurs potentielles applications à *A. phagocytophilum*. La partie expérimentale est divisée en deux grands chapitres. Le premier présente l'approche globale et le second l'approche ciblée sur la protéine Asp14. Enfin, la dernière partie de ce manuscrit est consacrée aux perspectives susceptibles d'émerger à partir de ce travail et aux conclusions pouvant en être tirées.

Etude bibliographique

Chapitre 1 : *Anaplasma phagocytophilum*, enjeu et problématique

I. Une classification remise en cause

I.A. Classification actuelle

Anaplasma phagocytophilum est une alphaprotéobactérie, appartenant à l'ordre des Rickettsiales, regroupant des bactéries à Gram négatif, intracellulaires strictes et transmises par des arthropodes hématophages. Depuis 2001, l'ordre des Rickettsiales est subdivisé en deux familles distinctes, à savoir la famille des *Rickettsiaceae*, bactéries se multipliant librement dans le cytoplasme de la cellule hôte, et la famille des *Anaplasmataceae*, qui se multiplient dans une vacuole cytoplasmique dérivée de la cellule hôte. Cette classification repose sur une étude phylogénétique qui a comparé les séquences nucléotidiques codant l'ARNr 16S (ARN ribosomal) et *groESL* (Dumler et al., 2001).

La famille des *Anaplasmataceae* regroupe actuellement cinq genres différents auxquels s'ajoute un genre candidat. Il s'agit des genres *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Aegyptianella*, *Neorickettsia*, *Wolbachia* et « *Candidatus Neoehrlichia* » (Pruneau et al., 2014). Les *Anaplasmataceae* infectent des hôtes vertébrés et invertébrés (tiques, trématodes, nématodes, insectes ou mollusques). Le cycle de vie d'*Anaplasma* et d'*Ehrlichia* nécessite une alternance entre hôtes vertébrés et invertébrés, contrairement à celui des genres *Neorickettsia* et *Wolbachia*, qui peuvent être transmis entre générations d'hôtes invertébrés, par transmission transovarienne et transstadiale (Pruneau et al., 2014). *In vivo*, les *Anaplasmataceae* infectent principalement des cellules hématopoïétiques matures et immatures, différentes selon les espèces (Pruneau et al., 2014). Au sein des *Anaplasmataceae*, *Anaplasma phagocytophilum* et *Ehrlichia chaffeensis*, sont les espèces les plus étudiées (Pruneau et al., 2014).

Le genre *Anaplasma* comprend 7 espèces différentes : *A. bovis*, *A. candidum*, *A. centrale*, *A. marginale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum*, et *A. platys*. De nouvelles espèces encore non classifiées sont décrites et ce genre est donc amené à évoluer dans le futur (Rar et al., 2021). Les bactéries du genre *Anaplasma* peuvent provoquer des infections chez les humains et les mammifères, avec différents degrés de gravité. *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. ovis* et *A. bovis*, ont par exemple un impact important sur la productivité des animaux d'élevage.

I.B. Histoire et évolution taxonomique

Depuis 1951, la position taxonomique actuelle d'*A. phagocytophilum* a été modifiée à de nombreuses reprises. La découverte de l'anaplasmose granulocytaire remonte à 1932, lors d'une étude réalisée en Ecosse sur le virus Louping ill, transmis par les tiques et affectant les moutons (Gordon et al., 1932). L'équipe de Gordon *et al.* a découvert une nouvelle maladie également transmissible par les tiques, sans lien avec le virus étudié et responsable d'hyperthermies. Cette nouvelle maladie a été dénommée TBF (*Tick-Borne Fever*) mais l'agent responsable n'a été décrit qu'en 1951, et a alors été baptisé *Rickettsia phagocytophila* (Foggie, 1951). Par la suite, la bactérie a été reclassifiée en tant que *Cytoecetes phagocytophila* en 1962, en raison de sa ressemblance morphologique avec *Cytoecetes microti* (Foggie, 1962) puis en 1974, en tant qu'*Ehrlichia phagocytophila* (Philip, 1974). Par la suite, deux autres espèces ont été découvertes : *E. equi*, décrite chez les chevaux en 1969 (Gribble, 1969) et l'agent responsable de l'ehrlichiose granulocytaire humaine, décrit en 1994 (Bakken et al., 1994; Chen et al., 1994).

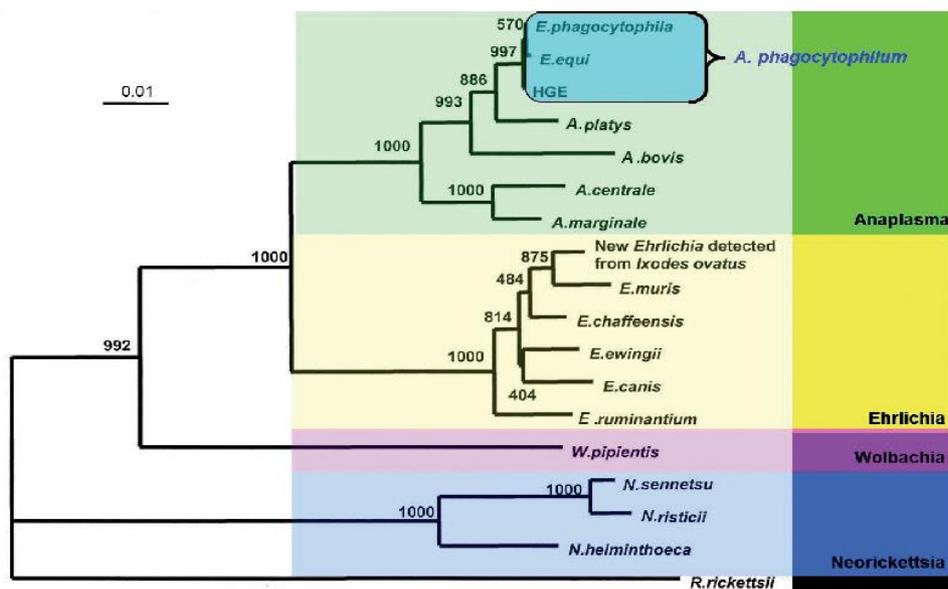


Figure 1 Arbre phylogénétique des *Anaplasmataceae* basé sur l'ARNr 16S (Inokuma *et al.*, 2001a)

En 2001, Dumler *et al.* ont proposé la réunification d'*E. phagocytophila*, *E. equi* et l'agent responsable de l'ehrlichiose granulocytaire humaine (HGE) en une seule et unique espèce, nommée *A. phagocytophilum*, suite à la comparaison des séquences codant l'ARNr 16S et *groESL* (Dumler et al., 2001). Cette nouvelle classification a été confirmée par deux autres études d'Inokuma *et al.*, comparant l'ARNr 16S (**Figure 1**) et les séquences nucléotidiques du gène *gltA* de la citrate synthase (Inokuma et al., 2001b, 2001a). La comparaison des

séquences d'acides aminés de 31 protéines codées par des gènes de ménage a également confirmé la classification actuelle d'*A. phagocytophilum* (Dunning Hotopp et al., 2006).

Cependant, plusieurs études ont montré la présence de nombreux variants génétiques, cliniques et biologiques, selon l'espèce hôte, l'espèce de tique, et selon l'origine géographique (Rar et al., 2021). Les premières études de phylogénie se basaient sur l'analyse d'un seul locus (*ARNr 16S*, *ankA* ou *msp2/msp4* (*major surface protein*) codant pour des protéines de surface) ou sur une analyse multilocus par MLST (*MultiLocus Sequence Typing*) ou par MLVA (*Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis*), dans tous les cas non représentatifs du génome complet. L'amélioration des techniques de biologie moléculaire avec notamment l'apparition du séquençage à haut débit devrait permettre de comparer les génomes d'*A. phagocytophilum*, entre eux et avec d'autres espèces d'*Anaplasma*. Il est ainsi possible que la position taxonomique de cette espèce évolue dans le futur.

Pour l'heure, seulement 33 génomes d'*A. phagocytophilum* sont disponibles sur la base de données NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), dont 27 sont complets. Ces génomes ne sont pas représentatifs de la diversité globale d'*A. phagocytophilum* et de l'ensemble des espèces hôtes, puisqu'un tiers des génomes sont issus de souches humaines isolées aux Etats-Unis (12 génomes). Ce faible nombre et cette absence de représentativité sont imputables à la grande difficulté de culture d'*A. phagocytophilum*, rendant la réalisation du séquençage particulièrement complexe.

A. phagocytophilum est une bactérie de l'ordre des Rickettsiales, de la famille des *Anaplasmataceae* et du genre *Anaplasma*. Au cours de l'histoire, sa position taxonomique a été modifiée de nombreuses fois. Depuis 2001, sur la base de comparaisons uniquement basées sur la séquence de l'*ARNr 16S* et celle de l'opéron *groESL*, *A. phagocytophilum* regroupe les trois ex-espèces suivantes : *E. phagocytophila*, *E. equi* et l'agent responsable de l'HGE. La position taxonomique d'*A. phagocytophilum* est possiblement amenée à évoluer dans le futur, avec la mise en œuvre de techniques fondées sur le séquençage du génome complet, qui pourraient aider à mieux rendre compte de la diversité des nombreux variants en circulation, particulièrement en Europe.

II. L'anaplasmose granulocytaire, une ou plusieurs maladies ?

A. phagocytophilum est l'agent responsable de l'anaplasmose granulocytaire, posant un/des problèmes en santé publique et en santé animale. Cette maladie multi-hôtes se caractérise par une variabilité de signes cliniques, qui dépendent de l'espèce hôte, de la zone géographique et de la pathogénicité/virulence des variants associés (Rar et al., 2021).

II.A. L'anaplasmose granulocytaire humaine (AGH)

Le premier cas d'anaplasmose granulocytaire humaine a été décrit en 1990 aux Etats-Unis, chez un patient décédé suite à un syndrome pseudo-grippal sévère, deux semaines après une pique de tique (Chen et al., 1994). En Europe, des cas similaires d'infection ont été observés dès 1995 en Suisse et au Royaume-Uni (Brouqui et al., 1995; Sumption et al., 1995). Depuis, des cas d'AGH ont également été décrits sur le continent asiatique et en Australie.

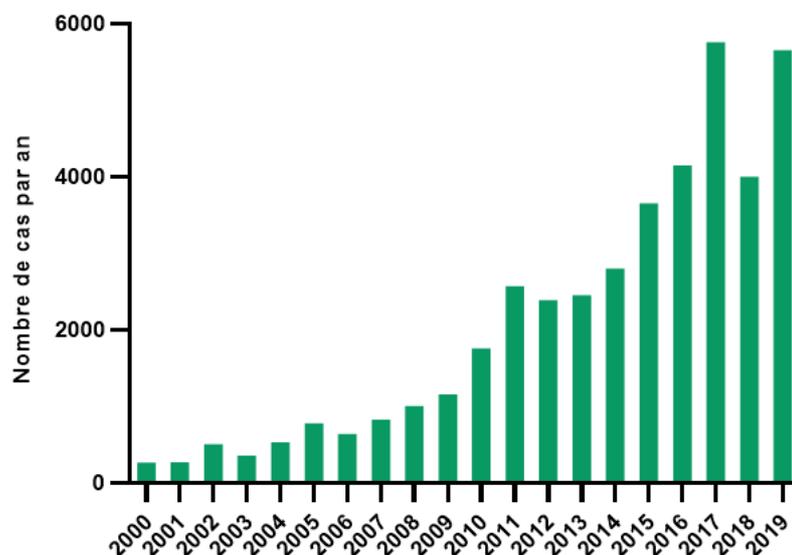


Figure 2 Nombre de cas d'anaplasmose granulocytaire humaine rapportés par an aux Etats-Unis, entre 2000 et 2019 (CDC, 2022).

Aux Etats-Unis, l'incidence de l'AGH est en constante augmentation. Plus de 37 000 cas ont été rapportés entre 2008 et 2019 (CDC, 2022). Cette augmentation est le reflet d'une augmentation probable du nombre de cas, mais est également imputable au fait que les cas doivent être déclarés depuis 1999. En Europe, l'incidence reste faible et ne dépasse pas 300 cas rapportés entre 2004 et 2019 (Matei et al., 2019). En revanche, la séroprévalence de l'AGH est élevée, des anticorps contre *A. phagocytophilum* ont été mis en évidence chez 2% à 28% des populations étudiées dans les pays européens, contre 11 à 15% de la population

étudiée aux Etats-Unis (Rar et al., 2021). Il existe donc une discordance entre l'incidence de l'AGH et la séroprévalence de l'infection par *A. phagocytophilum* en dehors des Etats-Unis. Cette discordance pourrait résulter à la fois d'une proportion plus élevée des cas d'infection asymptomatique par rapport aux Etats-Unis mais aussi d'une fréquence plus élevée des cas avec une expression clinique moins sévère et peu spécifique, qui échappent au diagnostic. Cette sous-estimation est d'autant plus plausible que beaucoup de cliniciens ignorent l'existence de cette maladie dans les pays européens qui hébergent pourtant cette bactérie zoonotique.

Les signes cliniques de l'AGH sont variables, allant d'une atteinte très bénigne à des cas plus sévères. Aux Etats-Unis, il existe une corrélation entre sévérité d'une part et âge et présence de comorbidités chez le patient d'autre part (Bakken and Dumler, 2015). Une étude récente a décrit les caractéristiques cliniques des cas d'AGH publiés au cours des 20 dernières années dans le monde (Dumic et al., 2022). La majorité des patients présente un syndrome pseudo-grippal non spécifique qui s'accompagne d'hyperthermies, de malaises, myalgies et céphalées. Les symptômes gastro-intestinaux sont également fréquents (diarrhées, nausées, anorexies ou douleurs abdominales) (Dumic et al., 2022). Une minorité des patients développe des manifestations plus sévères, notamment des arthralgies, des lésions rénales aiguës, des atteintes de la rate (splénomégalie,...), des voies respiratoires (toux, syndrome de détresse respiratoire aiguë), ou encore du système nerveux central (Dumic et al., 2022). Des modifications hématologiques et biochimiques sont observées, comme une thrombocytopénie, une leucopénie, une anémie et des taux élevés de transaminases hépatiques (Dumic et al., 2022). Des cas de co-infections avec d'autres agents pathogènes transmis par les mêmes espèces de tiques ont été également rapportés, notamment avec *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Matei et al., 2019). Aux Etats-Unis, 36% des patients infectés par *A. phagocytophilum* nécessitent une hospitalisation et 7% d'entre eux nécessitent des soins intensifs. Le taux de létalité est estimé entre 0,6 et 1% (Dumler, 2012). Ce taux de létalité est plus élevé chez les patients immunodéprimés, atteignant 18,2% (2 patients sur 11) (Dumic et al., 2022). En Europe, les signes cliniques sont similaires à ceux décrits aux Etats-Unis mais sont généralement moins sévères. Ainsi à ce jour, aucun décès n'a été rapporté (Matei et al., 2019).

La majorité des patients atteints d'AGH rapportent une piqûre de tique, une à deux semaines avant l'apparition des premiers symptômes. Horowitz a décrit un cas de transmission périnatale d'*A. phagocytophilum* (Horowitz et al., 1998). En Chine, un cluster de patients a été atteint d'AGH suite à une exposition nosocomiale, par contact direct avec du sang ou des sécrétions respiratoires provenant d'un patient infecté dans un hôpital (Zhang et al., 2008).

Enfin, entre 1997 et 2020, dix cas d'infection par *A. phagocytophilum* ont été rapportés suite à une transfusion de produits sanguins contaminés aux Etats-Unis (Mowla et al., 2021). Certains des produits sanguins impliqués étaient leuco-déplétés, remettant donc en cause l'efficacité de cette technique (Mowla et al., 2021). Une étude supplémentaire a également montré que la déplétion en leucocytes réduisait mais n'éliminait pas le risque de transmission d'*A. phagocytophilum* (Proctor and Leiby, 2015). Les produits sanguins ne faisant actuellement pas l'objet d'un dépistage systématique d'*A. phagocytophilum*, la prévalence de ces produits contaminés par *A. phagocytophilum* est donc probablement plus importante que celle actuellement rapportée (Dumic et al., 2022).

Il existe donc une différence en termes d'incidence et de sévérité entre l'AGH induite par les souches humaines américaines *versus* européennes. L'hypothèse de la présence de souches potentiellement plus virulentes aux Etats-Unis a été avancée et est considérée comme très plausible. Actuellement, la variabilité génétique et les différences de pathogénicité/virulence n'ont pas été suffisamment explorées pour expliquer ces disparités.

II.B. L'anaplasmosse granulocytaire des ruminants domestiques

L'anaplasmosse granulocytaire des ruminants domestiques, également dénommée ehrlichiose ou TBF est très répandue en Europe. En revanche, aux Etats-Unis, l'infection semble rare et à ce jour, seuls des cas d'infection asymptomatique ont été décrits (Eleftheriou et al., 2022). Des études ont montré une réactivité sérologique croisée entre *A. phagocytophilum* et *A. marginale* (Hoar et al., 2008, Eleftheriou et al., 2022). Or, aux Etats-Unis, l'infection par *A. marginale* est fréquente chez les bovins et est responsable de signes cliniques sévères (anémie, ictère, affaiblissement, hyperthermie,...) (Hoar et al., 2008). De ce fait, cette bactérie est particulièrement recherchée et de nombreuses études ont évalué sa séroprévalence au sein des élevages (Eleftheriou et al., 2022). La réactivité croisée observée entre les deux espèces a donc pu biaiser ces études de séroprévalence en induisant une surestimation de la prévalence d'infection par *A. marginale*. La combinaison de techniques sérologiques et moléculaires est donc indispensable pour estimer correctement la part réelle d'*A. phagocytophilum* dans les infections par des bactéries du genre *Anaplasma* chez les ruminants domestiques aux Etats-Unis.

En Europe, les moutons semblent particulièrement exposés, avec une séroprévalence qui a été estimée à plus de 80% en Norvège il y a une vingtaine d'années (Stuen et Bergström, 2001). Les signes cliniques chez les ruminants sont surtout observés chez les jeunes animaux ou chez les adultes déplacés pour la première fois dans des zones de pâtures infectées par les tiques (Stuen, 2007). Les premiers signes cliniques se développent une à trois semaines

après la/les pique(s) de tique. Sont décrits une forte hyperthermie, une anorexie, des avortements, une chute de la production laitière et des œdèmes au niveau des membres locomoteurs (syndrome «des gros paturons ») (Tuomi, 1967). Des infections secondaires, touchant notamment les voies respiratoires, sont souvent décrites et sont favorisées par la baisse de l'immunité qu'engendre *A. phagocytophilum* (Woldehiwet, 2010). La pyohémie à tiques causée par *Staphylococcus aureus* est une complication sévère et fatale : jusqu'à 30% des agneaux infectés par *A. phagocytophilum* développent cette complication (Woldehiwet, 2010). L'anaplasmose granulocytaire entraîne donc un affaiblissement généralisé de l'animal. L'ensemble des manifestations cliniques associées à *A. phagocytophilum* a pour conséquence des pertes économiques majeures au sein des élevages de bovins et d'ovins. Par exemple, les pertes liées aux avortements sont estimées entre 500 et 900 euros par bovin, en fonction du stade de gestation, des coûts d'alimentation, de la perte de lait qui en résulte et de la valeur des coûts de remplacement (Sarangi et al., 2021).

II.C. L'anaplasmose granulocytaire chez les autres espèces domestiques

Contrairement à la TBF, l'anaplasmose granulocytaire équine a été décrite aux Etats-Unis, en Europe, au Canada, en Amérique du Sud, en Asie et en Afrique (Rar et al., 2021). La période d'incubation est comprise entre une et deux semaines avec des manifestations cliniques similaires à celles de la TBF. Dans les cas les plus sévères, les chevaux infectés peuvent développer des œdèmes sous-cutanés, des hémorragies, et des lésions inflammatoires de certains organes, entraînant le décès de l'animal (Pusterla et Madigan, 2013).

L'anaplasmose granulocytaire affecte également les chiens et les chats. Chez les chiens, l'infection a été rapportée aux Etats-Unis, en Amérique du Sud, en Europe, en Asie et en Afrique (El Hamiani Khatat et al., 2021). Des cas félins ont été rapportés en Europe, en Asie et aux Etats-Unis (Rar et al., 2021). Les signes cliniques sont similaires chez ces deux espèces hôtes, avec des signes fréquents d'hyperthermie, de léthargie, d'anorexie ou d'inappétence et des douleurs musculosquelettiques (Schäfer and Kohn, 2020; El Hamiani Khatat et al., 2021).

II.D. Diagnostic de l'anaplasmose granulocytaire et dépistage de l'infection

II.D.1. Méthodes directes

L'anaplasmose granulocytaire est une maladie difficile à diagnostiquer car les signes cliniques sont souvent peu caractéristiques, et la présentation clinique peut varier considérablement en fonction de l'hôte infecté et d'autres facteurs tels que l'état immunitaire et les co-infections (Matei et al., 2019). Les techniques de diagnostic et/ou de dépistage présentées ci-dessous sont identiques chez les animaux et les humains, même si les kits diffèrent en fonction des espèces pour certaines techniques.

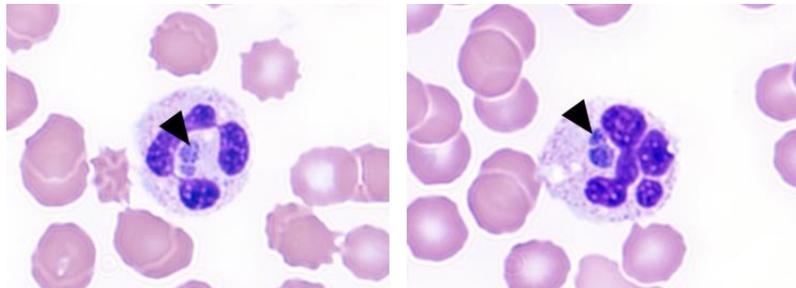


Figure 3 Neutrophiles infectés par *A. phagocytophilum* (flèches) chez un chien, observés sur un frottis sanguin après coloration différentielle (UMR BIPAR, 2023).

A. phagocytophilum infecte majoritairement les granulocytes neutrophiles, où elle se multiplie au sein de vacuoles cytoplasmiques nommées « morulae », pouvant contenir plusieurs bactéries (**Figure 3**). Durant la phase aiguë de l'infection, la recherche de morulae d'*A. phagocytophilum* dans le cytoplasme des neutrophiles peut s'effectuer jusqu'à 4 à 5 jours après le début des signes cliniques par l'observation microscopique de frottis sanguin (**Figure 3**). La coloration différentielle de type Romanowsky est réalisée avec des colorants tels que le May-Grünwald Giemsa ou Diff-Quick™, les bactéries apparaissant en bleu foncé à pourpre au microscope optique. Cette méthode peu coûteuse manque considérablement de sensibilité puisqu'elle dépend de l'expérience de l'observateur, de la quantité relative de granulocytes neutrophiles et du niveau de bactériémie. Les morulae sont difficiles à détecter, du fait de la très faible prévalence d'infection des cellules hôtes. Cette technique nécessite donc une analyse longue et détaillée du frottis au microscope. Seuls 25 à 70% des patients atteints d'AGH aux Etats-Unis possédaient des morulae détectables dans les frottis sanguins (Aguero-Rosenfeld et al., 1996; Bakken et al., 1996). Ainsi, un résultat négatif en microscopie ne permet pas d'exclure une infection et cet examen doit être combiné avec d'autres tests de diagnostic/dépistage, comme la détection moléculaire par PCR (*Polymerase chain reaction*). Plusieurs techniques de PCR (conventionnelle, nichée, en temps réel, multiplex) existent pour

la détection d'*A. phagocytophilum* dans le sang et les tissus, jusqu'à 10 jours après le début des signes cliniques (Reller and Dumler, 2018). Cependant la sensibilité de cette technique dépend de plusieurs facteurs comme la nature et la qualité de l'échantillon, la quantité d'ADN bactérien dans le sang, le nombre de copies génomiques des gènes cibles et la longueur de l'amplicon (Brouqui et al., 2004). Les méthodes basées sur la PCR ne sont pas encore normalisées et peuvent donner des résultats divergents, plusieurs cibles PCR ayant été décrites. Les gènes fréquemment recherchés sont le gène conservé de l'ARNr 16S, ceux codant pour des protéines de surface majeures MSP2 ou MSP4, ou encore l'opéron *groESL*. Une confirmation supplémentaire des résultats positifs par séquençage est fortement conseillée. Une autre méthode de détection, rarement utilisée dans le cadre du diagnostic/dépistage d'une infection, est la mise en culture *in vitro* qui permet également l'isolement de variants. Goodman *et al.* ont été les premiers à isoler et cultiver un isolat humain à partir de sang infecté dans un modèle cellulaire HL-60 (*human promyelocytic leukemia cells*) (Goodman et al., 1996). La mise en culture dépend cependant de la disponibilité de cellules permissives vis-à-vis d'*A. phagocytophilum* en laboratoire, qui reste très limitée. En outre, la probabilité et le délai d'obtention d'une culture positive sont peu compatibles avec les contraintes de diagnostic.

II.D.2. Méthodes indirectes

La recherche d'anticorps spécifiques peut être réalisée à l'aide de techniques sérologiques, comme les tests d'immunofluorescence indirecte (IFA) ou ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*). Le CDC recommande actuellement le test IFA pour le diagnostic/dépistage sérologique de l'anaplasmose granulocytaire (Tagliafierro et al., 2022). Selon les fabricants, la spécificité de ce test est estimée à 100% et la sensibilité varie entre 66,7% et 100%, selon la période d'échantillonnage et le début des signes cliniques (Matei et al., 2019). Les tests ELISA présentent une sensibilité et une spécificité comparables à celles des tests IFA. Parmi les tests commercialisés, le test SNAP 4Dx Plus® (IDEXX) est utilisé pour l'espèce canine pour la détection d'anticorps dirigés contre *A. phagocytophilum* à partir de sérum, plasma ou sang total, directement au cabinet du vétérinaire, mais ne permet pas de différencier cette espèce d'*A. platys* (Stuen, 2007).

Comme mentionné précédemment, des réactivités sérologiques croisées entre *A. marginale* et *A. phagocytophilum* ont été observées pour les ruminants domestiques (Dreher et al., 2005; Hoar et al., 2008). Des bovins, moutons et chevaux infectés expérimentalement par *A. phagocytophilum* ont produit des anticorps qui ont été détectés à la fois par un test IFA utilisant des morulae d'*A. phagocytophilum* et à la fois par un test ELISA utilisant la protéine MSP5 d'*A. marginale* (Dreher et al., 2005). Ces observations ont donc des conséquences

importantes pour le dépistage des infections par *A. phagocytophilum* et les résultats des tests utilisés doivent être interprétés avec prudence.

II.E. Traitement et prophylaxie

L'antibiothérapie est actuellement la seule stratégie thérapeutique. Les tétracyclines, antibiotiques à large spectre à pénétration intracellulaire et peu coûteux, constituent la famille d'antibiotiques de choix pour lutter contre l'anaplasmose granulocytaire. La doxycycline, administrée par voie orale ou intraveineuse, est efficace contre l'anaplasmose granulocytaire humaine, canine et féline (Stuen, 2007; Matei et al., 2019). En cas d'allergie à la doxycycline, la rifampicine est proposée par voie orale. L'oxytétracycline est utilisée efficacement chez les ruminants pour traiter la TBF. Bien qu'efficace, l'utilisation des antibiotiques participe à l'augmentation de l'antibiorésistance. Actuellement, aucun cas de rechute ni de résistance aux antibiotiques n'a été observé pour *A. phagocytophilum* (Stuen, 2007). Cependant, du fait de leur large spectre, les tétracyclines altèrent notamment le microbiote et augmentent le risque de sélection de bactéries antibiorésistantes parmi des bactéries non ciblées.

Il n'existe actuellement pas de vaccin permettant de protéger contre *A. phagocytophilum* (Havlíková et al., 2013). L'utilisation prophylactique des antibiotiques au sein des élevages est interdite en Europe depuis 2016, du fait de son impact très négatif en termes d'amplification de l'antibiorésistance (Santé Publique France, 2022). La lutte contre les tiques est donc la principale mesure de prévention de l'anaplasmose granulocytaire. Cette lutte peut se faire par le biais de modifications de la végétation (élimination des broussailles, ...) ou par la mise en place de barrières entre le bétail et les zones de pâtures infestées par les tiques (Eisen, 2021). Chez les ruminants domestiques, la TBF est généralement contrôlée par l'administration prophylactique de produits acaricides durant les périodes d'activité des tiques. L'utilisation des acaricides est cependant de plus en plus controversée, en raison de leur impact sur l'environnement (bioaccumulation, effet sur d'autres espèces d'arthropodes non ciblées, ...) et du risque de sélection de tiques résistantes.

Les vaccins anti-tiques sont également des outils potentiellement efficaces pour lutter contre les tiques et la transmission d'agents pathogènes. Au début des années 1990, le premier vaccin TickGARD™ a été développé et commercialisé en Australie, suivi du vaccin Gavac™ développé à Cuba et commercialisé en Amérique latine (Andreotti, 2006). Ces vaccins se composent tous les deux d'une protéine recombinante de *Rhipicephalus microplus*, Bm86 (Andreotti, 2006). Les hôtes immunisés produisent des anticorps spécifiques de cette protéine et ces anticorps ingérés par la tique entraînent des lésions hémorragiques au niveau de son

tube digestif, diminuant les capacités de gorgement, de reproduction et de ponte des tiques. Cependant, à ce jour, aucun de ces vaccins n'a été un succès commercial durable, TickGARD™ n'est plus disponible sur le marché et Gavac™ a une disponibilité limitée. Ces vaccins ont démontré une efficacité variable selon l'espèce de tiques (de Vos et al., 2001). Ils nécessitent également plusieurs rappels de vaccination et doivent être intégrés dans une stratégie de gestion qui comprend également l'utilisation d'acaricides à une fréquence réduite.

D'autres candidats vaccins semblent prometteurs et agissent sur le gorgement, la reproduction des tiques, et/ou ciblent leurs défenses immunitaires (Muhanguzi et al., 2022). Cependant, la problématique reste la même : l'efficacité de ces candidats vaccins varie selon l'agent pathogène et l'espèce de tique. Par exemple, la subolésine est impliquée dans la réponse immunitaire innée de la tique et dans d'autres voies, notamment l'alimentation, la fertilité, l'infection et la réplication/multiplication des agents pathogènes (Muhanguzi et al., 2022). L'inhibition du gène de la subolésine par siRNA (petit ARN interférent) a permis de réduire le gorgement, le poids et la ponte des tiques (Lu et al., 2016). Des études expérimentales ont montré que la vaccination avec la subolésine recombinante a permis de réduire l'infection des tiques par différents agents pathogènes tels qu'*A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *Babesia bigemina* et *Borrelia burgdorferi*. Cependant, cette vaccination s'est montrée inefficace pour le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV, *Tick-Borne Encephalitis Virus*) (Havlíková et al., 2013). La difficulté majeure réside donc dans le développement d'un vaccin universel, efficace contre plusieurs espèces de tiques et limitant les cas de co-infections (Parizi et al., 2012).

Des vaccins anti-tiques qui ont pour cible le microbiote de la tique sont en cours d'étude. Selon sa composition, le microbiote digestif de la tique semble moduler la colonisation et la réplication/multiplication des agents pathogènes, dont le tube digestif constitue la première porte d'entrée (Bonnet et al., 2017). Mateos-Hernandez *et al.* ont montré que certaines entérobactéries du microbiote de la tique, en particulier des bactéries du genre *Escherichia* et *Shigella*, représentent une part dominante du microbiote, à la fois d'un point de vue quantitatif et en tant qu'élément central du réseau de bactéries du microbiote (Mateos-Hernández et al., 2020). Récemment, Wu-Chuang *et al.* ont montré que l'inoculation à des souris de *B. afzelii* entraîne une perturbation du microbiote de la tique, qui se traduit par une diminution des bactéries du taxon *Escherichia-Shigella*, en parallèle à une augmentation de leur réseau avec les autres bactéries du microbiote. Un vaccin anti-microbiote composé d'*E. coli* BL21 a été administré chez des souris qui ont ensuite été infectées par *B. afzelii*. Suite à cette vaccination, les souris ont produit des anticorps dirigés contre la bactérie *E. coli*, qui ont affecté le microbiote des tiques gorgées. En effet, une diminution du réseau d'interaction entre *Escherichia-Shigella* et les autres bactéries du microbiote a été constatée, associée à une

réduction de la charge bactérienne en *B. afzelii*, dans l'organisme de la tique. Ces résultats tendent à indiquer que *B. afzelii* est sensible à la perturbation du microbiote de la tique induite par la vaccination visant à perturber l'équilibre du microbiote de la tique (Wu-Chuang et al., 2023). Des études supplémentaires sont nécessaires pour prouver l'efficacité de ces vaccins et pour mieux comprendre l'implication du microbiote de la tique dans la transmission des agents pathogènes. En outre, la question des effets secondaires possibles pour les espèces hôtes doit être examinée, comme la perturbation de leur propre microbiote intestinal.

Les méthodes de diagnostic actuelles souffrent pour la plupart d'un manque de sensibilité, la charge bactérienne étant souvent faible dans les prélèvements. Une méthode de capture de la bactérie directement dans les échantillons sanguins donnerait la possibilité de concentrer la bactérie dans un plus faible volume et par conséquent, d'améliorer la sensibilité de ces méthodes. Les stratégies thérapeutiques actuelles reposent uniquement sur l'antibiothérapie, mesure très efficace mais qui ne répond pas de façon optimale à l'approche One Health. Les stratégies vaccinales sont quant à elles absentes et les recherches actuelles reposent sur l'identification d'un candidat vaccin efficace contre plusieurs espèces de tiques, sans résultat probant à ce jour. L'identification de molécules jouant un rôle crucial dans l'infection serait donc une réelle opportunité pour développer de nouvelles stratégies à la fois thérapeutiques et vaccinales.

III. Des cycles épidémiologiques complexes

A. phagocytophilum est une bactérie vectorisée infectant de nombreuses espèces animales sauvages et domestiques. Les cycles épidémiologiques d'*A. phagocytophilum* sont complexes et impliquent la circulation de nombreux variants (Jaarsma et al., 2019).

III.A. Les vecteurs

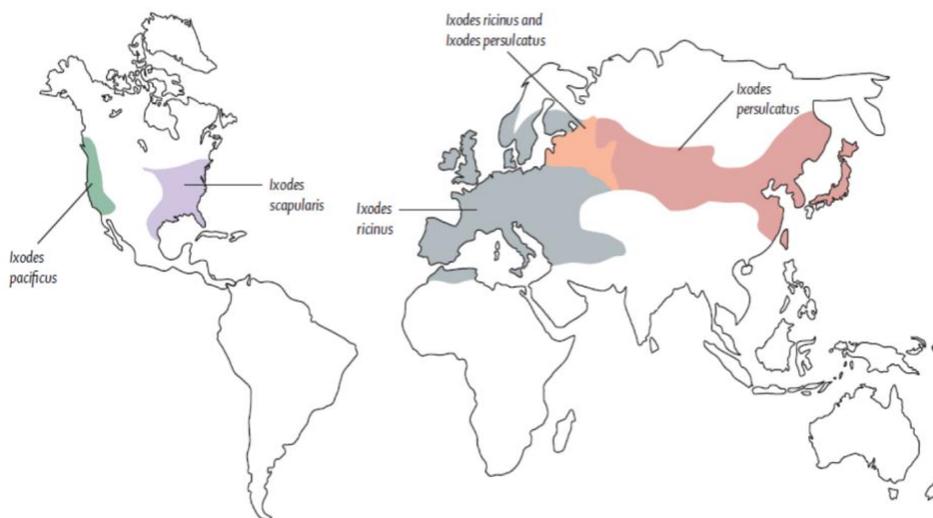


Figure 4 Répartition géographique des tiques dures du genre *Ixodes* dans le monde (Stuen, 2007).

A. phagocytophilum est transmise par les tiques dures de la famille des *Ixodidae*. Ses principaux vecteurs sont *I. ricinus* en Europe, *I. scapularis* et *I. pacificus* à l'Est et à l'Ouest des Etats-Unis respectivement et enfin *I. persulcatus* en Europe de l'Est et en Asie (**Figure 4**). La compétence vectorielle a été prouvée pour ces espèces de tiques (Stuen, 2007). La prévalence d'infection des tiques par détection de l'ADN bactérien varie entre les pays et les continents. En Europe, elle est estimée entre 1% et 20% chez *I. ricinus* et entre 1% et 50% chez *I. scapularis* aux Etats-Unis (Stuen, 2007). La bactérie a également été détectée chez d'autres espèces de tiques, comme chez des espèces du genre *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* ou encore *Hyalomma*... (Zeidner et al., 2000; Bown et al., 2003; Dugat et al., 2017). Cependant, la compétence vectorielle de ces espèces reste à explorer (Matei et al., 2019).

Les tiques sont des arthropodes hématophages qui se nourrissent exclusivement de sang et vivent en alternance librement dans l'environnement ou fixées à des hôtes vertébrés (Boulanger et al., 2019). Les tiques du genre *Ixodes* se caractérisent par un cycle de vie triphasique, c'est-à-dire impliquant trois individus hôtes, avec trois stades de développement : larve, nymphe et adulte (Bonnet et al., 2017). Après accouplement et gorgement, les femelles pondent des œufs qui éclosent pour libérer des larves (**Figure 5**). Les larves présentes dans le milieu extérieur trouvent un hôte et se nourrissent. Après gorgement, elles se détachent, tombent au sol et se métamorphosent en nymphes. Les nymphes cherchent un nouvel hôte pour réaliser un repas sanguin (Bonnet et al., 2017). Une fois au sol, la nymphe se métamorphose en un adulte mâle ou femelle. La rencontre entre mâles et femelles et la fécondation ont lieu soit au sol, soit sur un nouvel hôte. La femelle ne se gorge ensuite

totalément que si elle a été fécondée, puis se détache pour trouver au sol un endroit favorable où pondre ses œufs (entre 2000 et 3000), puis finit par mourir. A l'exception du mâle adulte qui ne se nourrit pas, chaque stade effectue un unique repas sanguin. La tique acquiert la bactérie lors d'un repas sanguin sur un hôte vertébré infecté. Lors du passage de l'hôte à la tique, la bactérie s'installe dans les cellules du tube digestif de la tique et migre vers les glandes salivaires. Après sa mue, la tique transmet la bactérie à un hôte vertébré sain lors du repas sanguin suivant.

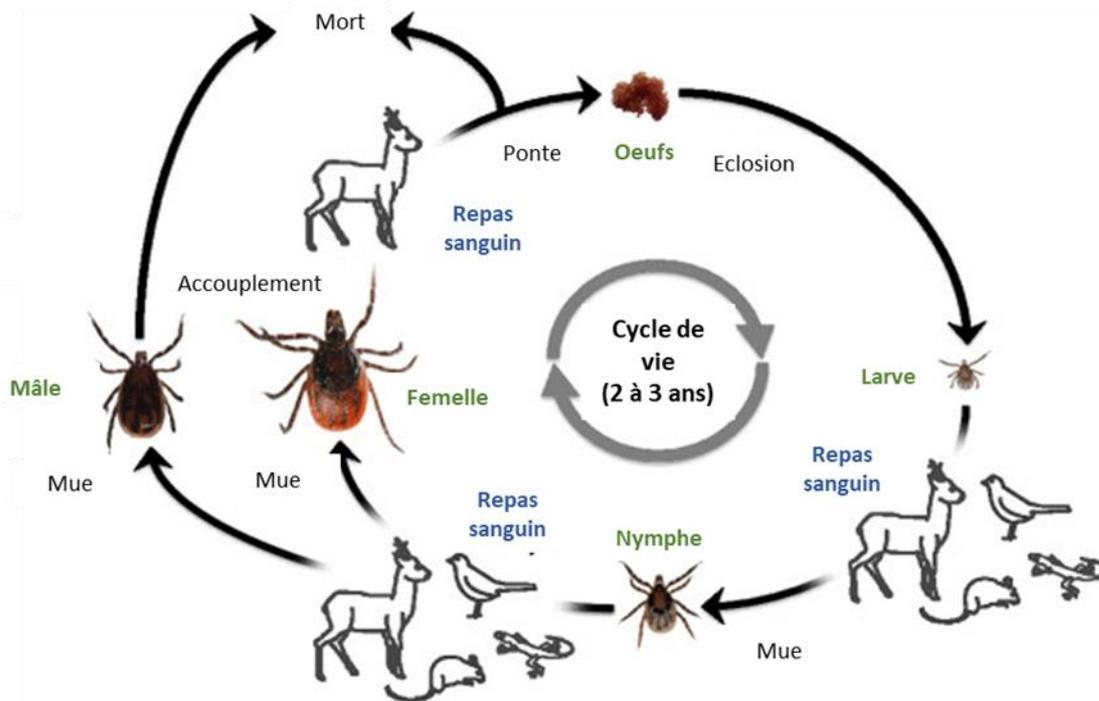


Figure 5 Cycle biologique d'*I. ricinus* (Herrmann and Gern, 2015).

Chez les espèces du genre *Ixodes*, la transmission transovarienne (transmission de l'agent pathogène à la descendance de la tique) n'a pas été prouvée à ce jour pour *A. phagocytophilum* (Dugat et al., 2015). Après la mue, la tique reste donc infectée par transmission transstadiale : elle transmet *A. phagocytophilum* au stade de développement suivant, du stade larvaire au stade nymphal et du stade nymphal au stade adulte (Dugat et al., 2015). La transmission par « co-feeding » de tiques infectées à des tiques non infectées lorsqu'elles se nourrissent à proximité sur un hôte n'a pas été signalée pour *A. phagocytophilum* (Matei et al., 2019).

I. ricinus est l'espèce de tique la plus fréquemment rencontrée et le principal vecteur d'*A. phagocytophilum* en Europe (Stuen et al., 2013a). Il s'agit d'une espèce dite télotrope, capable de se nourrir sur un large éventail d'hôtes, incluant plus de 300 espèces animales différentes (Rizzoli et al., 2014). Les larves se nourrissent préférentiellement sur de petits mammifères (rongeurs) et des oiseaux, les nymphes privilégient les mammifères un peu plus grands (lapins, renards...), tandis que les adultes se nourrissent préférentiellement sur les

grands mammifères, tels que les ruminants. Les humains peuvent être parasités par tous les stades. Ce large éventail d'hôtes favorise la diffusion d'*A. phagocytophilum* au sein des écosystèmes et augmente potentiellement le risque de transmission zoonotique. La répartition d'*I. ricinus* dépend du climat (température, hygrométrie), de l'altitude et de la végétation rencontrée. Cette tique est exophile, car disséminée dans des habitats extérieurs divers, ouverts ou semi-ouverts (prairie, forêt,...), dans des zones tempérées avec une température comprise entre 10°C et 30°C environ et une humidité relative supérieure à 80% (Rizzoli et al., 2014). En Europe, une expansion du territoire d'*I. ricinus* a été mise en évidence ces dernières années, ces tiques étant notamment retrouvées à de plus hautes altitudes (>1500m). Cette expansion du territoire est imputée à différents facteurs, comme le réchauffement climatique, la reforestation et l'augmentation des effectifs de certaines espèces sauvages nourricières, comme les cervidés et les sangliers (Jore et al., 2011; Semenza and Suk, 2018).

III.B. Les hôtes vertébrés

Les hôtes vertébrés peuvent jouer des rôles très divers dans les cycles d'*A. phagocytophilum*, comme celui de réservoir ou d'élément d'un réservoir multi-espèces, ou hôte de liaison et/ou hôte nourricier et/ou hôte cul-de-sac épidémiologique.

A. phagocytophilum pris dans son ensemble infecte une large gamme d'hôtes vertébrés. Les humains, les animaux domestiques comme les chiens, les chats, les chevaux, les bovins et les ovins sont des hôtes réceptifs et sensibles, capables d'être infectés et de développer des signes cliniques. En revanche, de nombreuses espèces sauvages très diverses, comme des cervidés, des rongeurs, des sangliers, des insectivores, des carnivores, des oiseaux et plus rarement des reptiles, ont été mentionnés comme infectés par *A. phagocytophilum* sans manifestations cliniques (Rar et al., 2021).

Pour maintenir la survie d'*A. phagocytophilum* de façon pérenne, le rôle des espèces dites réservoirs est crucial, puisque ce sont elles qui garantissent la pérennisation de la bactérie, au sein de l'écosystème considéré, sur le long terme (Kahl et al., 2002). Cela est d'autant plus important dans le cas d'*A. phagocytophilum* qu'il n'y a pas de transmission transovarienne (Dugat et al., 2017).

Certaines espèces sauvages peuvent également jouer le rôle d'hôtes de liaison, c'est-à-dire facilitant la transmission d'*A. phagocytophilum* entre les hôtes réservoirs et les hôtes sensibles, notamment lorsque les contacts entre ces deux catégories d'hôtes sont peu fréquents (Dugat et al., 2015).

Par ailleurs, les oiseaux migrateurs et les cervidés parcourent des distances importantes et peuvent donc participer soit à la dissémination des bactéries qu'ils hébergent en tant qu'hôtes réservoir ou de liaison, soit à la dissémination des tiques infectées et ce, quel que soit leur rôle dans le cadre du cycle épidémiologique (réservoir, hôte de liaison, hôte nourricier des tiques).

Le large éventail d'hôtes vertébrés et d'espèces de tiques vectrices explique en partie la diversité des souches d'*A. phagocytophilum* et impacte les cycles épidémiologiques, en induisant des cycles bactériens restreints à une espèce de tique vectrice (ou à un nombre limité d'espèces) et à certaines espèces hôtes.

III.C. Les cycles épidémiologiques

III.C.1. Aux Etats-Unis

Aux Etats-Unis, deux variants génétiques prédominent et leurs cycles épidémiologiques ont pu être identifiés, l'un zoonotique et l'autre pas. Les variations du gène de l'*ARNr 16S* et du gène *msp4* ont permis de distinguer au moins deux principaux variants génétiques, qui diffèrent au niveau de deux nucléotides, les variants Ap-ha et Ap-V1 (Massung et al., 2002). Ces deux variants coexistent dans la même zone géographique, ils peuvent être transmis par *I. scapularis*, aussi bien à l'Est qu'à l'Ouest des Etats-Unis. Seul le variant Ap-ha est transmis par *I. pacificus* à l'Ouest du pays (**Figure 6**).

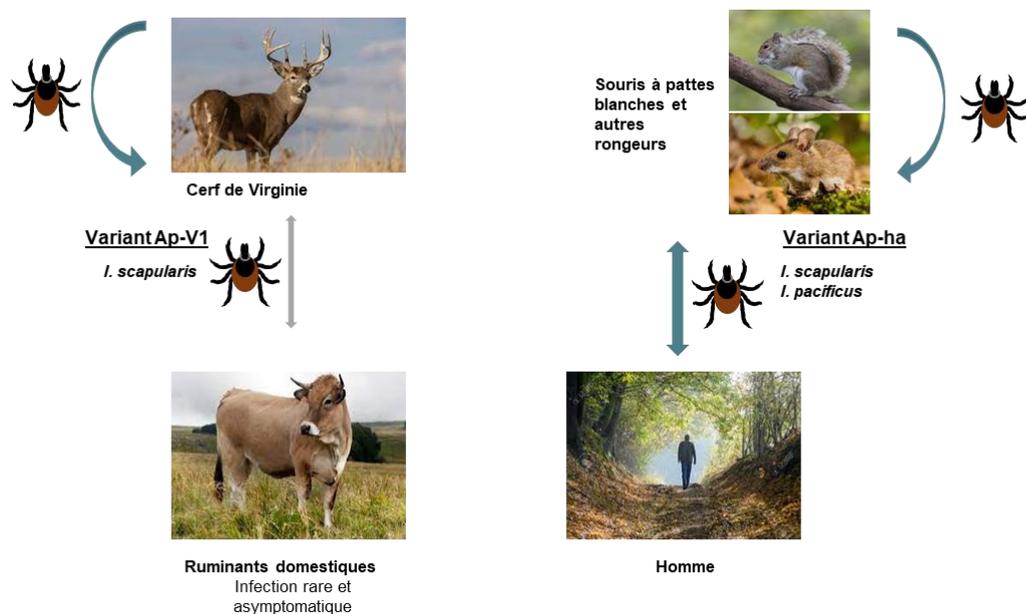


Figure 6 Cycles épidémiologiques supposés d'*A. phagocytophilum* aux Etats-Unis. Une flèche bleue représente une transmission prouvée. Une flèche grise représente une transmission possible. Illustration adaptée de Dugat, 2014.

Ces deux variants se caractérisent par leur spécificité vis-à-vis de certaines catégories d'hôtes et sont donc impliqués dans des cycles épidémiologiques distincts (**Figure 6**). A notre connaissance, seuls deux cas bovins asymptomatiques détectés par PCR ont été rapportés aux Etats-Unis (Eleftheriou et al., 2022). Cependant, comme mentionné précédemment, l'infection par *A. phagocytophilum* des ruminants domestiques qui n'a quasiment jamais été recherchée jusqu'à présent aurait pu être masquée par l'infection par *A. marginale*. En outre, il a été montré que le variant Ap-V1 peut infecter des chèvres expérimentalement, l'infection ayant été objectivée par des réactions PCR positives associées à une séroconversion, et pour une chèvre, par des signes cliniques discrets (Massung et al., 2006). Le réservoir identifié pour ce variant est le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) et ce variant n'a jamais été impliqué dans des infections humaines (Massung et al., 2005). Le variant Ap-ha infecte les humains, les chiens et les chevaux. Son réservoir majeur est la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*) (Massung et al., 2003). D'autres rongeurs comme l'écureuil gris (*Sciurus carolinensis*), le néotome à pattes sombres (*Neotoma fuscipes*) et le tamia séquoia (*Tamias ochrogenys*) sont également considérés comme des réservoirs possibles d'*A. phagocytophilum* aux Etats-Unis. D'autres variants ont pu être détectés, sur la base de l'ARNr 16S, comme par exemple les variants 1 à 5, différents des variants Ap-V1 et Ap-ha, détectés chez des chiens atteints d'anaplasmose granulocytaire (Poitout et al., 2005). Cependant, ces variants n'ont pas été confirmés, en raison d'un manque de données épidémiologiques.

III.C.2. En Europe

En Europe, les cycles épidémiologiques ne sont pas aisés à préciser, contrairement aux Etats-Unis. A ce jour, les hôtes réservoirs n'ont toujours pas été identifiés avec certitude et les cycles auxquels ils participent lorsque c'est le cas ne sont pas avérés. Les études de prévalence chez les populations domestiques et sauvages ont donc montré que plusieurs souches d'*A. phagocytophilum* circulent et que certaines semblent spécifiques, en l'état actuel des connaissances, de leur(s) vecteur(s) et/ou de certaines espèces d'hôtes vertébrés (**Figure 7**).

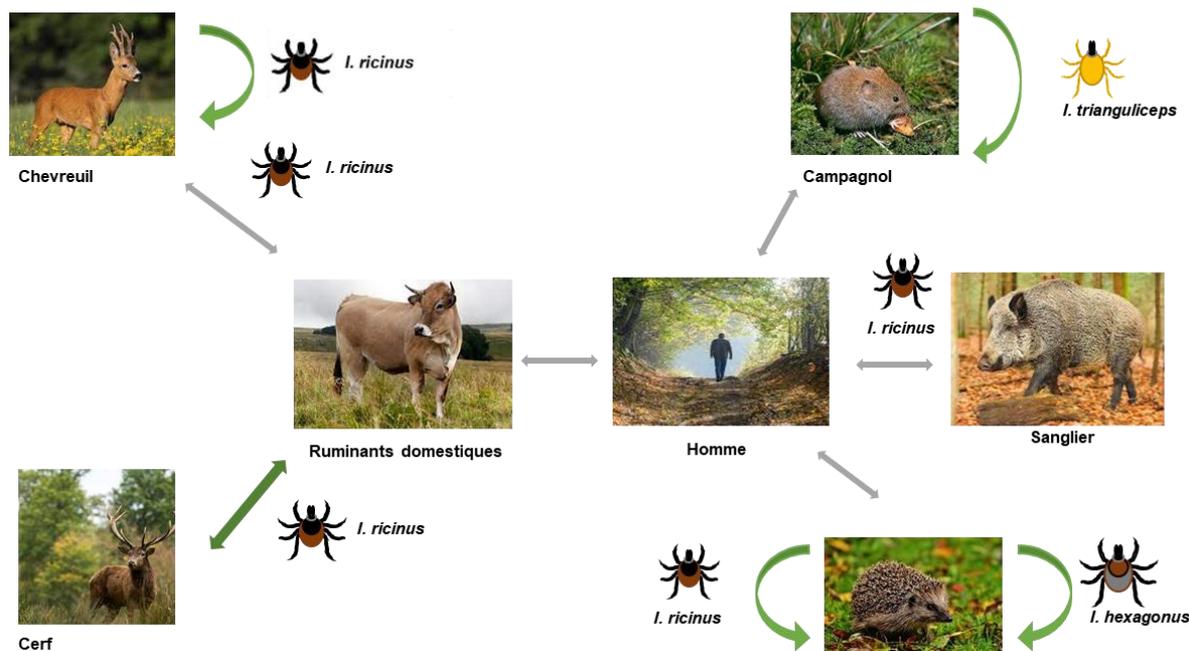


Figure 7 Cycles épidémiologiques supposés d'*A. phagocytophilum* en Europe, adaptée de Dugat, 2014. Une flèche verte représente une transmission très probable. Une flèche grise représente une transmission dont la probabilité est plus faible.

De nombreuses études ont suggéré le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) et le chevreuil (*Capreolus capreolus*) comme réservoirs potentiels des souches affectant les ruminants domestiques, du fait de la prévalence importante de l'infection asymptomatique de ces espèces animales par *A. phagocytophilum* et de la persistance de l'infection qui peut aller jusqu'à trois mois chez le cerf élaphe (Stuen et al., 2001). L'ADN d'*A. phagocytophilum* a été retrouvé chez 87,5% et 98,9% des cerfs élaphe et des chevreuils testés respectivement (Alberdi et al., 2000; Overzier et al., 2013). Cependant, plusieurs études ont montré que les chevreuils ne sont pas des hôtes réservoirs pour les variants trouvés chez les humains, les chiens, les chevaux et les ruminants domestiques. Il semblerait qu'ils soient réservoirs de leurs propres souches avec un cycle épidémiologique indépendant (Chastagner et al., 2015; Dugat et al., 2016; Huhn et al., 2014). Pour le cerf, aucun lien n'a été établi avec le groupe des souches infectant les humains, le chien et le cheval. Cependant, son rôle dans les cycles épidémiologiques infectant les ruminants domestiques est moins clair. Stuen *et al.* ont étudié le gène *msp4* de quatre échantillons de cerfs. Trois d'entre eux appartenaient à un groupe de souches phylogénétiquement éloignées de celles rencontrées chez les ovins (Stuen et al., 2013b). Un échantillon était au contraire étroitement lié à des génotypes associés à un large éventail d'hôtes, y compris les ovins. Des études basées sur les séquences des gènes *ankA*, *groESL* et plus récemment, sur les techniques MLST et MLVA, suggèrent un rôle de réservoir des cerfs élaphe pour les souches des ruminants domestiques (Petrovec et al., 2002; Huhn et al., 2014; Dugat et al., 2016b).

Les moutons (*Ovis aries*) sont envisagés comme intervenant dans un cycle épidémiologique propre dans lequel ils joueraient le rôle d'hôtes réservoirs de leurs propres souches (*i.e.* celles auxquelles ils sont sensibles). Cela a été suggéré en raison de la forte prévalence d'infection chez cette espèce et de la persistance d'*A. phagocytophilum* chez des individus de l'espèce (Rar et al., 2021). Ainsi, lors d'études expérimentales, l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été retrouvé par qPCR 358 jours après l'infection. Un tel rôle de réservoir pourrait expliquer le nombre annuel élevé de cas d'anaplasmose granulocytaire chez les moutons des pays concernés (Thomas et al., 2012). L'étude de Dugat *et al.* a montré une proximité des profils MLVA de certaines souches rencontrées chez les bovins et les souches ovines typées, mais cette étude très parcellaire ne permet pas de déterminer si les bovins et ovins s'intègrent dans un même cycle épidémiologique et/ou participent à des cycles indépendants et dans quelles proportions (Dugat et al., 2016b). Or, cette information pourrait être cruciale pour la maîtrise des risques d'infection de ces deux espèces.

D'autres études ont avancé que le hérisson (*Erinaceus europaeus*) et le sanglier (*Sus scrofa*) pouvaient être des réservoirs potentiels pour les souches humaines, sur la base de séquences nucléotidiques du gène de l'ARNr 16S (Silaghi et al., 2012, 2014). La prévalence de l'infection chez le hérisson a été estimée entre 25% et 80% et il s'agit d'une espèce souvent parasitée par les tiques, notamment par *I. ricinus* et *I. hexagonus* (Stuen, 2007). Chez le sanglier, la prévalence d'infection a été estimée entre 2 et 12% (Dugat et al., 2015). Une étude MSLT a révélé que les variants infectant les hérissons, sangliers et les humains se regroupent lorsque ces gènes de ménage sont testés (Huhn et al, 2014). Cependant, outre le fait qu'une faible partie du génome a été comparée, la durée d'infection chez ces animaux semble assez courte, remettant en cause leurs rôles d'hôtes réservoirs (Dugat et al., 2015). L'ADN d'*A. phagocytophilum* a été détecté par PCR seulement jusqu'à 30 jours après l'infection de sangliers (Galindo et al., 2012). De plus, les hérissons semblent être impliqués dans un cycle épidémiologique indépendant, avec pour vecteur *I. hexagonus* (**Figure 7**). Une étude analysant le gène codant pour l'ARNr 16S a suggéré que les variants présents chez *I. hexagonus* pourraient également infecter *I. ricinus*, ces cycles épidémiologiques étant donc susceptibles d'être connectés (Dugat et al., 2015). En outre, une étude épidémiologique a été réalisée au sein de notre équipe pour rechercher la présence d'*A. phagocytophilum* par PCR quantitative ciblant le gène *msp2*, à partir de prélèvements de rate et de peau de hérissons d'Ile-de-France. Le taux de prévalence de l'infection à *A. phagocytophilum* a été de 3,1% en 2021 (12 positifs sur un total de 385 individus) et de 5,6% en 2022 (9 positifs sur un total de 159 individus). Ces prévalences étant faibles, il est peu probable que les hérissons jouent le rôle d'espèce réservoir dans la région étudiée, bien que des études supplémentaires soient nécessaires. Les rongeurs sont des hôtes privilégiés du stade larvaire des tiques et des hôtes

potentiels du stade nymphal. L'ADN d'*A. phagocytophilum* a été détecté chez une dizaine d'espèces de rongeurs en Europe (Stuen et al., 2013b). Cependant, la prévalence de l'infection reste faible dans les études réalisées (Dugat et al., 2015). Les rongeurs semblent être également impliqués dans un cycle épidémiologique indépendant décrit au Royaume-Uni, impliquant comme vecteur *I. trianguliceps* (Dugat et al., 2015).

La connaissance des cycles épidémiologiques d'*A. phagocytophilum* est essentielle pour la mise en place de mesures de contrôle de l'infection appropriées pour protéger les animaux domestiques et les humains. Cependant, ces cycles sont complexes, particulièrement en Europe, où ils ne sont pas encore clairement identifiés et les réservoirs seulement supposés. En effet, les études précédemment réalisées sont anciennes et se fondent sur la comparaison entre souches ou isolats, sur la base d'un seul gène (*ARNr 16S, ankA, groESL...*) ou d'un nombre très limité de gènes (MLST, MLVA), ce qui entache la crédibilité des résultats relatifs aux espèces réservoirs et aux cycles associés. Le séquençage à haut débit des souches circulantes permettrait d'obtenir des génomes complets d'*A. phagocytophilum* et de comparer les souches à des fins phylogénétiques, de taxonomie ou de typage. Cependant, peu de souches ont été isolées dans le monde et la charge bactérienne est faible dans les prélèvements sanguins. Le développement d'outils de capture de nouvelles souches à partir de prélèvements serait une réelle opportunité pour le séquençage et pour accroître le nombre de génomes disponibles.

IV. Des mécanismes d'interactions cellulaires et moléculaires à explorer

In vivo, *A. phagocytophilum* infecte très majoritairement les granulocytes neutrophiles chez les hôtes vertébrés. La bactérie a également été détectée dans les granulocytes éosinophiles, les monocytes et les cellules endothéliales (Dumler et al., 2001; Munderloh et al., 2004). Les cellules HL-60 sont actuellement les seules cellules vertébrées disponibles pour la culture d'*A. phagocytophilum*. Il existe également des modèles de cellules invertébrés, comme les cellules de tiques embryonnaires d'*I. scapularis* et d'*I. ricinus*. Les mécanismes d'interaction entre la bactérie et ses hôtes vertébrés et invertébrés sont essentiels à identifier pour comprendre les facteurs impliqués dans la pathogénicité et la virulence des différents variants. Cependant, ces derniers restent largement à explorer et peu de protéines d'*A. phagocytophilum* susceptibles de sous-tendre ces interactions ont été identifiées

(Tableau 1). Certains mécanismes moléculaires/cellulaires ont tout de même pu être identifiés et sont présentés dans cette partie.

IV.A. Cycle de développement intracellulaire

A. phagocytophilum est une bactérie à Gram négatif, de petite taille comprise entre 0,4 et 2 μm , pléomorphe, de forme coccoïde à ellipsoïde (Rikihisa, 2011). Cette bactérie se développe au sein d'une vacuole cytoplasmique dérivée de la cellule hôte, dénommée morula. *A. phagocytophilum* est dépourvue de peptidoglycane et de lipopolysaccharides (LPS), sa paroi est donc fragile (Underwood et al., 2022).

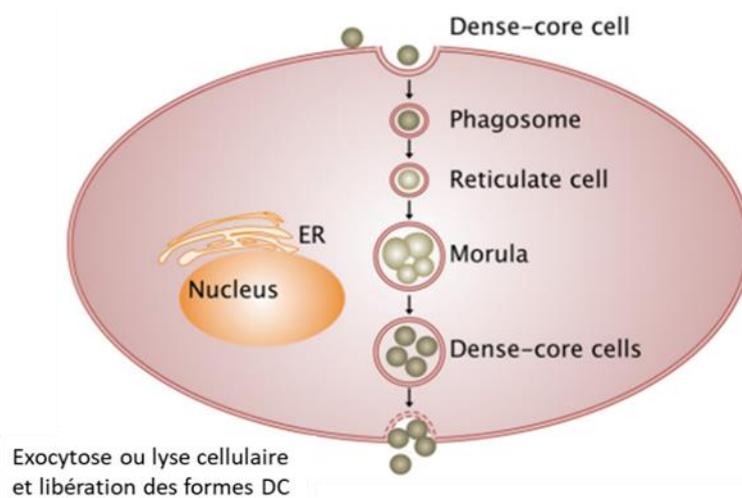


Figure 8 Cycle de développement intracellulaire d'*A. phagocytophilum* au sein des cellules de vertébrés (Pruneau et al., 2014).

Deux morphotypes d'*A. phagocytophilum* ont été identifiés par microscopie électronique : une forme DC (*dense-cored cell*) et une forme RC (*reticulate cell*), toutes deux présentes dans les cellules invertébrées et vertébrées (**Figure 8**) (Troese and Carlyon, 2009). La forme DC possède un nucléoïde dense et est résistante dans l'environnement. Il s'agit de la forme infectieuse d'*A. phagocytophilum*, capable de sortir de la cellule hôte pour en infecter une autre. La forme réticulée correspond à la forme intracellulaire et répliquative d'*A. phagocytophilum*. Ces formes sont également retrouvées chez d'autres bactéries intracellulaires strictes, comme le genre *Chlamydia*. Seule la forme DC se fixe aux cellules HL- 60 (Troese and Carlyon, 2009), alors que les deux formes DC et RC sont capables d'infecter les cellules de tiques ISE6 (Munderloh et al., 1999). Le cycle de développement intracellulaire a bien été décrit dans les cellules hôtes vertébrés (Troese and Carlyon, 2009). La forme infectieuse d'*A. phagocytophilum* pénètre dans le cytoplasme des granulocytes par endocytose, et notamment par le biais d'interactions entre des protéines de surface bactériennes et des récepteurs cellulaires. La multiplication intracellulaire débute dès 12h

post-infection, les formes DC internalisées se transforment alors en formes RC. Après 24h, un grand nombre de formes RC résident au sein des morulae et dès 36h, l'infection de nouvelles cellules a lieu, avec un relargage important des formes DC dans le milieu extérieur (**Figure 8**).

IV.B. Mécanismes cellulaires et moléculaires identifiés chez les hôtes vertébrés

IV.B.1. Adhésion et internalisation au sein de la cellule hôte vertébrée

A. phagocytophilum adhère à la cellule hôte afin d'assurer son internalisation et sa multiplication. Pour cela, elle interagit avec une protéine de surface des leucocytes, dénommée PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) (Truchan et al., 2013). L'engagement de PSGL-1 est essentiel pour l'infection des granulocytes neutrophiles humains et des cellules HL-60, en déclenchant la phosphorylation de ROK1 par Syk. Cette cascade de signalisation entraîne une réorganisation de l'actine et du cytosquelette, favorisant ainsi l'internalisation de la bactérie (Thomas and Fikrig, 2007). PSGL-1 est coiffée d'un O-glycane qui est décoré de façon terminale par le sialyl-Lewis-X, un tétrasaccharide qui comprend l'acide α 2,3-sialique et l' α 1,3-fucose. L'acide α 2,3-sialique et l' α 1,3-fucose sont nécessaires pour l'infection des granulocytes neutrophiles murins et des cellules HL-60 par *A. phagocytophilum* (Truchan et al., 2013). L'adhésion d'*A. phagocytophilum* et sa pénétration dans la cellule hôte se fait également par des voies indépendantes de PSGL-1, impliquant l'intégrine β 2 et les radeaux lipidiques (Lin and Rikihisa, 2003; Schaff et al., 2010). Les radeaux lipidiques sont d'importantes plateformes de signalisation et sont enrichies en protéines à ancrage GPI (glycosylphosphatidylinositol) et en cavéoline-1. Les protéines à ancrage GPI sont nécessaires à l'infection et la cavéoline-1 colocalise avec les vacuoles d'*A. phagocytophilum*, ce qui suggère que la bactérie pénètre dans les cellules hôtes par endocytose au niveau de ces radeaux (Truchan et al., 2013).

Enfin, l'adhésion et la liaison aux cellules hôtes impliquent des protéines situées sur la membrane externe d'*A. phagocytophilum*, nommées invasines ou adhésines. Seules quelques-unes ont pu être identifiées et les plus étudiées sont OmpA (*outer membrane protein A*), Asp14 (14 kDa *A. phagocytophilum* surface protein) et AipA (*A. phagocytophilum* invasion protein A) (Ojogun et al., 2012; Kahlon et al., 2013; Seidman et al., 2014). Ces trois protéines interagissent avec la surface des cellules hôtes vertébrés pour favoriser l'infection et coopèrent par des voies de signalisation complémentaires (Naimi et al., 2020). La protéine OmpA interagit avec la protéine PSGL-1 au niveau de l'acide α 2,3-sialique pour assurer l'entrée de la bactérie dans la cellule hôte (Ojogun et al., 2012). La protéine Asp14 agit avec la protéine

disulfure isomérase (PDI), exprimée à la surface des cellules de mammifères, et qui possède une activité de réductase (Green et al., 2020). Cette activité s'est montrée essentielle pour l'internalisation du virus du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), du virus de la Dengue, de *Leishmania chagasi* et de *Chlamydia trachomatis* dans les cellules de l'hôte (Green et al., 2020). Une étude récente a montré que l'interaction d'Asp14 avec la PDI permet de réduire les liaisons disulfure présentes à la surface bactérienne et assure ainsi l'entrée optimale d'*A. phagocytophilum* dans les cellules hôtes (Green et al., 2020). Le récepteur d'AipA est quant à lui encore inconnu (Seidman et al., 2014).

D'autres protéines semblent également impliquées dans l'adhésion et l'invasion d'*A. phagocytophilum*. C'est le cas d'Asp55, Asp62 et APH_1235 (Troese et al., 2011). Des anticorps spécifiques d'Asp55, Asp62 et APH_1235 ont permis d'inhiber l'infection des cellules hôtes par *A. phagocytophilum* mais leurs récepteurs et leurs rôles précis restent encore inconnus. La protéine MSP2 (P44) est une protéine transmembranaire abondamment retrouvée à la surface d'*A. phagocytophilum* et est impliquée notamment dans l'adhésion et la multiplication intracellulaire (Park et al., 2003; Sarkar et al., 2008). Cette protéine semble interagir avec l' α 1,3-fucose et/ou le peptide N-terminal du récepteur PSGL-1. Plus récemment, Contreras *et al.* ont montré que les protéines de surface d'*A. phagocytophilum* MSP4 et HSP70 (*Heat-shock protein*) forment un complexe pour permettre l'interaction de la bactérie avec les cellules hôtes vertébrées et invertébrées (Villar et al., 2015; Contreras et al., 2017). La vaccination utilisant ces protéines comme antigènes a conféré une protection partielle à des moutons vis-à-vis d'*A. phagocytophilum* (Contreras et al., 2017).

IV.B.2. Multiplication au sein de la cellule hôte vertébrée

Une fois dans la cellule hôte, *A. phagocytophilum* se développe au sein d'une vacuole cytoplasmique dont la membrane provient de la cellule infectée (**Figure 9**). Actuellement, seulement trois protéines d'*A. phagocytophilum* ont pu être identifiées comme étant associées à la membrane de l'inclusion : AptA, APH_1387 et APH_0032. La protéine AptA (*A. phagocytophilum* toxin A) joue un rôle essentiel dans le remodelage du cytosquelette et assure la survie intracellulaire de la bactérie. Cette protéine interagit avec la vimentine, qui active la phosphorylation de la voie Erk1/2 et qui réorganise le cytosquelette autour des vacuoles cytoplasmiques (Sukumaran et al., 2011; Ma et al., 2021). Ce phénomène a également été observé chez d'autres agents pathogènes intracellulaires stricts, comme *Toxoplasma gondii* et *Chlamydia trachomatis*. *A. phagocytophilum* exploite donc le cytosquelette de l'hôte pour assurer sa survie intracellulaire. Les deux protéines APH_1387 et APH_0032 se situent à la surface des formes RC d'*A. phagocytophilum* et sur la membrane

de la vacuole cytoplasmique (Huang et al., 2010; Oki et al., 2016) (**Figure 9**). Leur localisation membranaire suggère un rôle potentiel dans la biogénèse de la membrane d'inclusion, qui reste encore à déterminer (Oki et al., 2016).

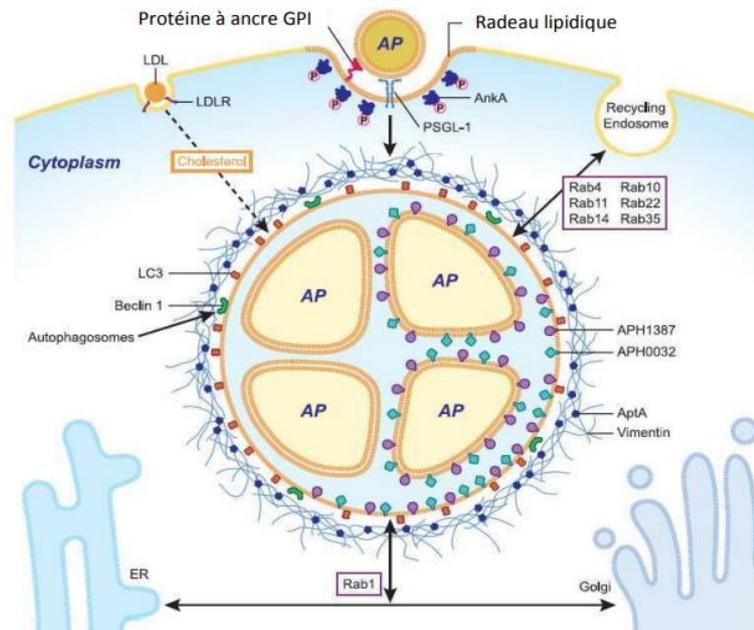


Figure 9 Multiplication d'*A. phagocytophilum* au sein des vacuoles cytoplasmiques de la cellule hôte vertébrée (Rikihisa, 2011).

Les vacuoles contenant *A. phagocytophilum* dans les cellules HL-60 sont enveloppées d'une membrane à double couche lipidique et colocalisent avec deux protéines cellulaires de l'autophagie, la bécline-1 et la protéine LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*). Ces vacuoles possèdent toutes les caractéristiques typiques des autophagosomes précoces (Niu et al., 2008). Ces autophagosomes ne se transforment pas en autophagosomes tardifs et ne fusionnent pas avec les lysosomes. Ils sont donc un refuge pour *A. phagocytophilum*, lui permettant de se multiplier et de survivre au sein des cellules (Niu et al., 2008). Le traitement des cellules HL-60 par la 3-méthyladénine, un inhibiteur pharmacologique de l'autophagie, a entraîné une baisse du niveau d'infection par *A. phagocytophilum*, démontrant que l'autophagie est essentielle à l'infection (Niu et al., 2012). *A. phagocytophilum* utilise cette voie afin de récupérer des nutriments nécessaires à sa croissance (Niu et al., 2012). Pour cela, la protéine Ats-1 (substrat 1 transloqué par *A. phagocytophilum*), protéine effectrice du système de sécrétion de type 4 (T4SS) d'*A. phagocytophilum*, se lie à la bécline-1 (Niu et al., 2012). Cette liaison entraîne la formation d'autophagosomes qui fusionnent avec les vacuoles d'*A. phagocytophilum*. Les autophagosomes sont ensuite dégradés pour fournir des acides aminés libres à la bactérie. Ce phénomène est encore peu expliqué mais il semblerait qu'*A. phagocytophilum* possède à

sa surface des protéases capables de digérer le contenu de ces autophagosomes (Niu et al., 2012).

IV.B.3. Mécanismes de survie

Pour assurer sa survie, *A. phagocytophilum* emploie de nombreuses stratégies telles que le détournement des voies métaboliques, l'inhibition de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou encore l'inhibition de l'apoptose et du système immunitaire de la cellule hôte. Les mécanismes précis restent encore à déterminer, seuls certains acteurs ont pu être identifiés.

A. phagocytophilum est capable de synthétiser la plupart des vitamines et des cofacteurs, mais synthétise seulement quatre acides aminés, la glycine, la glutamine, le glutamate et l'aspartate (Dunning Hotopp et al., 2006). Ainsi, les autres acides aminés et d'autres composés du métabolisme, comme le cholestérol, sont acquis par la bactérie grâce à la cellule hôte. Pour cela, elle exprime 41 gènes codant pour des molécules impliquées dans le transport et dans la liaison de protéines, et utilise les protéines de son système de sécrétion de type 4 pour interagir avec des molécules cellulaires et affecter le métabolisme de la cellule hôte (Dunning Hotopp et al., 2006). Actuellement, seulement deux protéines secrétées ont pu être identifiées, AnkA (protéine A riche en ankyrine) et Ats-1 (Lin et al., 2007; Niu et al., 2010). La protéine AnkA est capable de se lier à une variété de molécules dans la cellule, notamment les gènes codant pour des protéines à activité ATPase (adénosine triphosphatase), tyrosine phosphatase et NADPH déshydrogénase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate). Ats-1 (substrat 1 transloqué par *A. phagocytophilum*) joue quant à elle un rôle dans le détournement de l'autophagie, comme mentionné précédemment, et dans l'inhibition de l'apoptose au niveau des mitochondries (Niu et al., 2010).

L'absence de gènes liés à la synthèse de cholestérol oblige la bactérie à détourner les voies de transport du cholestérol de la cellule hôte, pour stabiliser sa membrane bactérienne dépourvue de LPS et de peptidoglycane (Huang et al., 2021). Ainsi, l'infection par *A. phagocytophilum* entraîne l'augmentation et l'accumulation des lipoprotéines de basse densité (LDL) endocytées par les cellules hôtes, en régulant le niveau cellulaire du récepteur aux LDL (Xiong et al., 2009). Le mécanisme de transport du cholestérol vers les inclusions bactériennes reste encore peu compris. Il semblerait que les protéines de liaison du cholestérol, correspondant à la cavéoline-1 et à la protéine NCP1 (Niemann-Pick type C1), jouent un rôle dans le détournement du transport du cholestérol, puisque ces deux protéines colocalisent avec les inclusions membranaires (Huang et al., 2021). Une étude récente a également démontré que les flotillines, et plus particulièrement FLOT1 et FLOT2, qui sont

aussi des protéines de liaison du cholestérol, facilitent le trafic vésiculaire du cholestérol vers les vacuoles d'*A. phagocytophilum* (Xiong et al., 2019).

Un des mécanismes antibactériens des granulocytes neutrophiles est la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la production d'ions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par la NADPH oxydase, lors de l'exposition à un agent pathogène. La NADPH oxydase constitue un complexe multiprotéique qui est dispersé dans différents compartiments. Lors d'une infection, les composants protéiques vont s'assembler pour générer des ROS. Il a été démontré qu'une infection par *A. phagocytophilum* empêche l'assemblage du complexe NADPH oxydase dans les granulocytes neutrophiles humains et murins et n'entraîne donc pas la production de ROS dans les cellules HL-60 (Carlyon et al., 2004; Artigas-Jerónimo et al., 2022).

Les granulocytes neutrophiles sont des cellules clés dans la réponse immunitaire innée. *A. phagocytophilum*, étant dépourvue de peptidoglycane et LPS, ne stimule pas les récepteurs transmembranaires Toll-like (TLR) présents à la surface des granulocytes neutrophiles (Lin and Rikihisa, 2003). *A. phagocytophilum* induit la production d'IL-8 et régule à la baisse l'expression de son récepteur (Sukumaran et al., 2005). Cette chimiokine stimule la migration des granulocytes neutrophiles vers le site de l'infection. Ainsi, les granulocytes neutrophiles humains migrent vers les cellules infectées par *A. phagocytophilum*, ce qui permet à cette dernière d'assurer un nouveau cycle d'infection (Akkoyunlu et al., 2001). Enfin, la protéine MSP2 (P44) est également impliquée dans l'échappement au système immunitaire et dans la persistance de la bactérie chez des hôtes immunocompétents (Barbet et al., 2003). Les hôtes vertébrés produisent des anticorps protecteurs contre cette protéine, qui possède une région hypervariable et de nombreux pseudogènes. Il s'ensuit donc une course-poursuite entre la variabilité génétique du gène *msp2* et la synthèse de nouveaux anticorps protecteurs, au fur et à mesure des changements au niveau de ce gène.

Les granulocytes neutrophiles ont une durée de vie très courte estimée à moins de 24h dans la circulation sanguine, ce qui rend a priori surprenant le fait qu'*A. phagocytophilum* puisse les infecter et s'y multiplier (Bonilla et al., 2020). Pour survivre dans ces cellules, *A. phagocytophilum* inhibe leur apoptose spontanée pendant 48 à 96h, ce qui lui laisse suffisamment de temps pour réaliser sa multiplication (Scaife et al., 2003; Li et al., 2022). Plusieurs études ont montré qu'*A. phagocytophilum* augmente l'expression de gènes anti-apoptotiques de la famille *bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*), inhibe l'activation de la caspase 8 par l'inhibition du clivage de la procaspase 8 (Lee and Goodman, 2006; Woldehiwet and Yavari, 2014; Alberdi et al., 2016a). En outre, la protéine Ats-1 se déplace à travers la membrane bactérienne et la membrane d'inclusion pour atteindre les mitochondries. Elle empêche ces

dernières de répondre aux signaux apoptotiques et induit l'expression de gènes anti-apoptotiques (Alberdi et al., 2016a).

De nombreuses protéines restent encore à identifier ainsi que l'étude de leur rôle dans l'infection. En effet, près de la moitié des cadres de lecture ouverts d'*A. phagocytophilum* codent pour des protéines hypothétiques conservées et qui n'ont jamais été caractérisées chez d'autres bactéries (Dunning Hotopp et al., 2006).

IV.C. Mécanismes cellulaires et moléculaires identifiés chez les hôtes invertébrés

Les mécanismes identifiés chez les hôtes invertébrés restent moins détaillés que ceux définis chez les cellules de vertébrés. Les lignées de cellules embryonnaires de tiques (ISE6...) et les tissus de tiques (glandes salivaires, intestins...) sont de bons modèles pour étudier les interactions entre les tiques et les agents pathogènes.

La première différence entre l'infection de cellules de tiques et de cellules de vertébrés réside dans l'apparence et le comportement d'*A. phagocytophilum*. L'infection au sein des cellules de tiques se caractérise par la présence importante d'agrégats bactériens : les cellules se remplissent de bactéries, grossissent et finissent par se lyser (Munderloh et al., 1999). Un degré de pléomorphisme plus élevé est par ailleurs observé dans les cellules de tiques infectées (Munderloh et al., 1999). Ces observations *in vitro* reflètent une adaptation d'*A. phagocytophilum* à ses hôtes vertébrés et invertébrés.

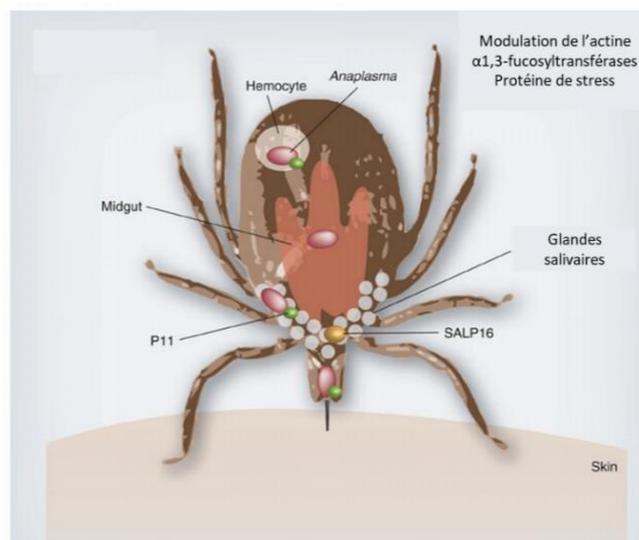


Figure 10 Mécanismes moléculaires et cellulaires mis en place par *A. phagocytophilum* pour assurer sa survie au sein de son vecteur, la tique (Severo et al., 2012).

Au sein de la tique, *A. phagocytophilum* infecte les premières cellules de l'intestin moyen puis les hémocytes et enfin les glandes salivaires (**Figure 10**). La protéine PSGL-1 étant absente chez le vecteur arthropode, *A. phagocytophilum* va mettre en place d'autres voies d'internalisation. Il a été montré que trois acteurs sont essentiels à l'acquisition de la bactérie et à sa dissémination au sein de la tique (Foley and Nieto, 2007). La protéine P11 est nécessaire pour assurer la migration d'*A. phagocytophilum* des hémocytes vers les glandes salivaires de la tique (Liu et al., 2011). La phosphorylation de l'actine entraîne la surexpression d'une protéine présente dans la salive d'*I. scapularis*, dénommée SALP16 (Sukumaran et al., 2006; Rikihisa, 2011). Cette phosphorylation de l'actine n'est pas retrouvée chez les cellules de vertébrés et est donc un mécanisme spécifique mis en place par *A. phagocytophilum* chez l'arthropode vecteur (Sultana et al., 2010). Enfin, les α 1,3-fucosyltransférases sont surexprimées chez les tiques infectées et leur blocage entraîne une diminution de l'infection par *A. phagocytophilum* au sein de son vecteur (Pedra et al., 2010). Des analyses transcriptomiques et protéomiques ont mis en évidence une différence dans l'expression de gènes entre le tube digestif et les glandes salivaires chez les tiques infectées (Villar et al., 2015). Le protéome d'*A. phagocytophilum* dans les glandes salivaires de la tique est associé à des protéines impliquées dans les réponses au stress et la synthèse protéique tandis que le protéome au niveau des intestins correspond à des protéines impliquées dans la division cellulaire, le repliement des protéines et le métabolisme. La forme infectieuse DC semble donc être localisée au niveau des glandes salivaires afin d'assurer la transmission d'*A. phagocytophilum* lors du prochain repas sanguin (Villar et al., 2015). Par ces études protéomiques, Villar *et al.* ont également mis en évidence la surexpression majeure de trois protéines de surface d'*A. phagocytophilum*, à savoir la protéine MSP4, la protéine chaperonne GroEL et la protéine de réponse au stress HSP70. Ces protéines semblent interagir ensemble pour former un complexe et faciliter les interactions entre la bactérie et les cellules de tiques. Les protéines GroEL et HSP70 fonctionnent notamment comme des chaperonnes pour protéger les cellules contre des dommages létaux induits par des stress, notamment en évitant des mauvais repliements de protéines (Villar et al., 2015).

Enfin, *A. phagocytophilum* met en place des mécanismes de survie communs lors de l'infection des tiques et des hôtes vertébrés, comme le remodelage du cytosquelette, l'inhibition de la génération de ROS, de l'apoptose et du système immunitaire (Alberdi et al., 2015, 2019). Chez *I. scapularis*, *A. phagocytophilum* altère le ratio entre les formes monomériques et filamenteuses de l'actine pour remodeler le cytosquelette (De la Fuente et al., 2016). *A. phagocytophilum* va également inhiber les voies apoptotiques des mitochondries, en activant la voie de signalisation JAK/STAT chez son vecteur *I. scapularis* dans l'intestin et les glandes salivaires (De la Fuente et al., 2016). Dans les glandes salivaires,

la bactérie induit également une diminution de l'expression de porines, inhibant ainsi le cytochrome c et donc l'apoptose. Enfin, *A. phagocytophilum* va manipuler le système immunitaire de la tique à son profit, notamment en réduisant l'expression de défensines et de protéines antimicrobiennes chez *I. scapularis* (De la Fuente et al., 2016). Une étude génomique a également montré qu'*A. phagocytophilum* contrôle le métabolisme du glucose des cellules de tiques, en augmentant l'expression de gènes glycolytiques à son profit (Cabezas-Cruz et al., 2017). Enfin, *A. phagocytophilum* augmente la capacité de la tique à survivre à des températures plus froides, en augmentant la synthèse d'une protéine dite antigel et dénommée IAFGP (*Ixodes tick antifreeze glycoprotein*). Il existe donc une certaine symbiose entre la bactérie et son vecteur arthropode (Neelakanta et al., 2010).

A. phagocytophilum emploie des stratégies uniques pour survivre dans la cellule hôte. Cependant, ces mécanismes d'interactions moléculaires et cellulaires chez les hôtes vertébrés et invertébrés restent à explorer. A ce jour, seule une vingtaine de protéines sont identifiées et leur rôle potentiel caractérisé (**Tableau 1**). Il reste donc à identifier le rôle de nombreuses molécules effectrices d'*A. phagocytophilum*, qu'elles soient identifiées ou non, pour mieux comprendre les mécanismes d'infection et pour proposer le développement de nouvelles stratégies de diagnostic et thérapeutiques.

Tableau 1 Liste des protéines identifiées d'*A. phagocytophilum*, leur localisation, leur rôle identifié ou non et leur présence dans les hôtes vertébrés ou invertébrés.

Protéines	Localisation	Rôle	Hôtes vertébrés	Hôtes invertébrés	Références
1. Adhésion et internalisation					
OmpA	Protéine de surface	Invasine	Oui	Oui	(Ojogun et al., 2012)
Asp14	Protéine de surface	Invasine	Oui	Oui	(Kahlon et al., 2013)
AipA	Protéine de surface	Invasine	Oui	Non	(Seidman et al., 2014)
Asp55	Protéine de surface	Non connu	Oui	?	(Ge and Rikihisa, 2007)
Asp62	Protéine de surface	Non connu	Oui	?	(Ge and Rikihisa, 2007)
APH_1235	Protéine de surface	Non connu	Oui	?	(Mastronunzio et al., 2012)
MSP2	Protéine de surface	Variation antigénique, adhésion, activité des porines	Oui	?	(Sarkar et al., 2008)
MSP4	Protéine de surface	Interaction avec la cellule hôte	Oui	Oui	(Contreras et al., 2017)
HSP70	Protéine de surface	Interaction avec la cellule hôte	Oui	Oui	(Contreras et al., 2017)
GroEL	Protéine de surface	Interaction avec la cellule hôte	Oui	Oui	(Villar et al., 2015)
2. Multiplication intracellulaire					
AptA	Protéine de surface et à la membrane des vacuoles	Remodelage du cytosquelette	Oui	?	(Sukumaran et al., 2011)
AmpA (APH_1387)	Protéine de surface et à la membrane des vacuoles	Non connu	Oui	?	(Beyer et al., 2015)
APH_0032	Protéine de surface et à la membrane des vacuoles	Non connu	Oui	?	(Oki et al., 2016)
3. Mécanismes de survie					
Ats-1	Protéine sécrétée	Détournement de l'autophagie, inhibition de l'apoptose	Oui	?	(Niu et al., 2010)
AnkA	Protéine sécrétée	Métabolisme, inhibition des ROS	Oui	?	(Lin et al., 2007)

V. Problématique

Il ressort des parties précédentes résumant l'état de l'art sur *A. phagocytophilum* que de nombreuses questions restent en suspens. Ce manque de connaissances s'explique en grande partie par la difficulté d'isolement et de culture d'*A. phagocytophilum* et par le manque d'outils moléculaires disponibles.

Comme indiqué précédemment, l'isolement et la culture d'*A. phagocytophilum* confrontent à de nombreuses difficultés méthodologiques et techniques. En effet, elle infecte majoritairement les granulocytes neutrophiles, qui sont des cellules avec une durée de vie très courte, estimée à moins de 24h dans la circulation sanguine (Bonilla et al., 2020). Au sein des prélèvements sanguins, cette durée de vie dépend des conditions de stockage. Après 24h de stockage à température ambiante d'un sang total de porc, une étude a montré que la viabilité des neutrophiles était affectée (Bonilla et al., 2020). Néanmoins, comme indiqué précédemment, les granulocytes neutrophiles infectés par *A. phagocytophilum* voient leur apoptose spontanée inhibée pendant 48h à 96h (Scaife et al., 2003; Li et al., 2022). Parmi les cas de transmission par transfusion, il a été montré qu'*A. phagocytophilum* peut survivre pendant plus d'une semaine dans du sang réfrigéré (CDC, 2022). Pour autant, de nombreux éléments rendent l'isolement et l'entretien en culture cellulaire difficiles. Parmi ces éléments, on peut citer notamment :

- L'exposition des formes DC au contenu des granules libéré par l'autolyse des neutrophiles dans les tubes de prélèvement,
- La perte de protection des formes RC de leur environnement cellulaire protecteur, compte tenu de l'accélération de cette autolyse.

L'isolement de la bactérie doit donc être réalisé rapidement et stérilement, avant que les granulocytes neutrophiles n'entrent en apoptose. De plus, il s'agit d'une bactérie intracellulaire stricte, pour laquelle très peu de cellules permissives sont disponibles au laboratoire. Seules les cellules HL-60 permettent une multiplication bactérienne pouvant être jugée satisfaisante et ce uniquement pour les souches humaines d'*A. phagocytophilum*. Il n'est donc pas surprenant que très peu de souches d'*A. phagocytophilum* soient actuellement cultivées dans le monde (**Tableau 2**).

Tableau 2 Liste des souches isolées et cultivées d'*A. phagocytophilum*, les plus utilisées. Les lignes grisées indiquent les souches actuellement disponibles dans notre laboratoire.

Souche	Espèce	Origine	Cellules vertébrés HL-60	Cellules invertébrés ISE6/ID8/IR20	Références
NY18	Humaine	Etats-Unis	Oui	Oui	(Asanovich et al., 1997)
HZ	Humaine	Etats-Unis	Oui	Oui	(Sarkar et al., 2007)
HGE1	Humaine	Etats-Unis	Oui	Oui	(Sarkar et al., 2007)
&Webster	Humaine	Etats-Unis	Oui	Oui	(Inokuma et al., 2003)
NCH-1	Humaine	Etats-Unis	Oui	Oui	(Huang et al., 2010)
ApMuc01c	Canine	Europe	Non	Oui	(Dyachenko et al., 2013)
BV-49	Bovine	Europe	Non	Oui	(Mateos-Hernández et al., 2021)
RD10	Chevreuril	Europe	Non	Oui	(Silaghi et al., 2011)
Ap-V1	Chèvre	Etats-Unis	Non	Oui	(Massung et al., 2007)
MRK	Cheval	Etats-Unis	Oui	Oui	(Asanovich et al., 1997)
NV2Os	Ovine	Europe	Non	Oui	(Stuen et al., 2009)

V.A. Des modèles cellulaires limitées

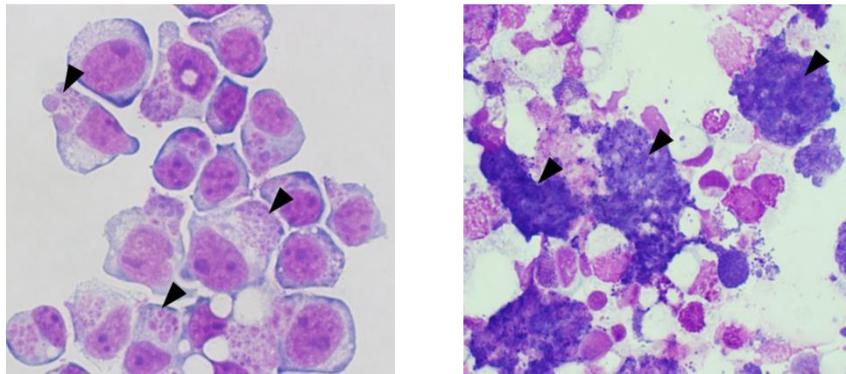


Figure 11 Cellules HL-60 infectées par la souche NY18 d'*A. phagocytophilum* (à gauche) et cellules de tiques ISE6 infectées par la souche NV2Os d'*A. phagocytophilum*, après coloration Hémacolor®.

V.A.1. Les cellules HL-60

La lignée cellulaire HL-60 a été isolée en 1977 chez une patiente atteinte de leucémie myéloïde aigüe. Ce sont des cellules promyélocytaires, précurseurs des granulocytes neutrophiles et basophiles et qui peuvent être amenées à se différencier, notamment en présence de DMSO (dimethyl sulfoxide) (Birnie, 1988). Cette lignée a permis d'isoler une souche humaine d'*A. phagocytophilum* en 1996 et s'est avérée sensible à l'infection puisqu'un effet cytopathique a été observé rapidement (Goodman et al., 1996). Cette lignée est aujourd'hui très utilisée pour cultiver les isolats humains et est un modèle cellulaire pertinent pour étudier les interactions d'*A. phagocytophilum* avec son hôte vertébré, puisqu'elle possède

les mêmes propriétés que les granulocytes neutrophiles (**Figure 11**). Cependant, cette lignée ne permet pas la culture de souches de ruminants (Massung et al., 2007). Actuellement, il n'existe pas de modèle cellulaire vertébré pour la culture de ces souches, ce qui empêche l'étude de leurs interactions avec leur(s) hôte(s) vertébré(s) au niveau cellulaire.

V.A.2. Les cellules de tiques

Pour étudier les interactions entre *A. phagocytophilum* et son vecteur, un modèle *in vitro* à partir de culture de cellules de tiques a été développé (**Figure 11**). Les lignées cellulaires de tiques sont pour la plupart des cellules embryonnaires, hétérogènes dans leur composition et sont constituées d'au moins deux types cellulaires (Oliver et al., 2015). Les cellules de tiques embryonnaires d'*I. scapularis*, principal vecteur d'*A. phagocytophilum* aux Etats-Unis, ont été les premières développées et permettent la culture de nombreuses souches d'*A. phagocytophilum*, notamment des souches d'origine européenne (Munderloh et al., 1994). En 1996, les cellules embryonnaires d'*I. scapularis* IDE8 ont permis d'isoler pour la première fois une souche équine (initialement baptisée *E. equi*), à partir du sang d'un cheval infecté. Ces cellules ont permis également l'isolement de souches ovines au Royaume-Uni (Woldehiwet et al., 2002), d'une souche canine européenne (Passos, 2012), d'une souche équine européenne (Passos, 2012) et d'une souche de chevreuil en Allemagne (Silaghi et al., 2011).

En 2013, les cellules embryonnaires d'*I. ricinus* IRE/CTVM20 (Bell-Sakyi et al., 2007) ont permis l'isolement et la culture de souches canines d'Allemagne et d'Autriche (Dyachenko, 2013). *I. ricinus* est le principal vecteur en Europe, et la culture des souches européennes dans ce modèle cellulaire permet donc de se rapprocher le plus des conditions naturelles d'infection du vecteur en Europe. Alberdi *et al.* ont montré des réponses différentes à l'infection chez les cellules IRE/CTMV20 et ISE6 (Alberdi et al., 2016b). La réponse transcriptionnelle des cellules ISE6 est similaire à celle observée dans les hémocytes des tiques. Quant aux cellules IRE/CTVM20, elles ont répondu à l'infection de la même façon que l'intestin moyen de la tique *in vivo*. Ces différents modèles cellulaires invertébrés sont de bons modèles pour étudier les interactions entre *A. phagocytophilum* et ses différents vecteurs. Cependant, les cellules de tiques ont une croissance lente et plusieurs semaines de culture sont nécessaires pour observer un niveau d'infection convenable.

V.A.3. Les cellules endothéliales

Munderloh *et al.* ont réussi à infecter des cellules endothéliales bovines et humaines avec *A. phagocytophilum* (Munderloh *et al.*, 2004). Ces cellules sont donc permissives pour la bactérie. Cependant, au sein de notre laboratoire, l'infection de cellules endothéliales humaines et bovines a échoué et peu d'études utilisent actuellement ce modèle de culture. Wang *et al.* ont mis en place un modèle *in vitro* imitant les conditions de flux physiologiques dans la microvascularisation (Wang *et al.*, 2015). Les granulocytes neutrophiles ont adhéré fortement aux cellules endothéliales infectées par *A. phagocytophilum*. Ces résultats suggèrent que les cellules endothéliales sont des sites de dissémination d'*A. phagocytophilum* vers les granulocytes du sang périphérique et qu'elles pourraient jouer le rôle de cellules niches pour maintenir une infection persistante chez l'hôte. Ce rôle reste encore hypothétique, aucune donnée n'étant venue le corroborer (Herron *et al.*, 2005).

V.B. Des outils moléculaires manquants

En plus de la difficulté d'isolement d'*A. phagocytophilum*, peu ou pas d'outils moléculaires sont actuellement disponibles. Les anticorps monoclonaux sont de bons outils pour la détection de cibles spécifiques et permettent certaines applications thérapeutiques. La première étude faisant état du développement d'anticorps monoclonaux ciblant *A. phagocytophilum* date de 2003 (Inokuma *et al.*, 2003). Dix anticorps monoclonaux de souris spécifiques de la protéine MSP2 de la souche humaine Webster d'*A. phagocytophilum* ont été produits. Ils ont permis d'identifier trois sérotypes différents, et donc de caractériser des isolats humains d'*A. phagocytophilum*. Par la suite, des anticorps monoclonaux ont été développés au cas par cas, selon les études et leurs objectifs. Par exemple, Park *et al.* ont développé des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine MSP2 afin d'étudier son rôle dans l'adhésion aux cellules HL-60 et aux granulocytes neutrophiles (Park *et al.*, 2003). Ces anticorps ne sont pas disponibles pour la communauté scientifique et actuellement, aucun anticorps monoclonal n'est commercialisé. Les chercheurs doivent donc nécessairement produire des anticorps monoclonaux pour étudier *A. phagocytophilum*. La méthode traditionnelle de production par le développement d'hybridomes nécessite entre 6 et 8 mois en moyenne pour obtenir une quantité raisonnable d'anticorps. En outre, elle implique une immunisation ultérieure d'animaux, ce qui entraîne des coûts supplémentaires considérables ainsi que des contraintes techniques et pose des problèmes éthiques (Smith *et al.*, 1995; Hammers and Stanley, 2014). La méthode alternative par phage display est une technique de production plus rapide mais reste très peu utilisée en laboratoire, en raison de sa complexité et de la technicité qu'elle implique.

Les acteurs moléculaires et les mécanismes des interactions entre la bactérie et ses hôtes vertébrés et invertébrés sont encore peu connus, limitant la mise en place de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques. Il existe donc une réelle nécessité de développer de nouveaux outils. Les aptamères, de par leurs avantages et leurs caractéristiques, sont des outils prometteurs pour étudier *A. phagocytophilum* et font l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 2 : Les aptamères, des ligands novateurs et prometteurs

Les aptamères sont des séquences d'acides nucléiques simple brin, principalement de l'ARN (acide ribonucléique) ou de l'ADN simple brin, capables de se lier spécifiquement à une molécule cible, avec une affinité et une spécificité élevées, grâce à leur structure tridimensionnelle unique.

I. Histoire et évolution

I.A. Découverte

Dans les années 1980, le rôle de ligand des acides nucléiques a été mis en évidence par des études réalisées sur le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et les adénovirus. Les adénovirus produisent une séquence d'ARN capable d'inhiber l'activité de la protéine kinase R induite par l'interféron, permettant au virus de contrecarrer la réponse immunitaire antivirale (Burgert et al., 2002). Le VIH, quant à lui, produit également une courte séquence d'ARN, dénommée TAR pour « transactivation response », capable de se lier à la protéine virale TAT (*transactivateur of transcription*), modulant ainsi la réplication virale (Cullen and Greene, 1989).

Deux études révolutionnaires réalisées en 1990 sont à l'origine de la découverte des aptamères et de leurs méthodes de sélection (Tuerk and Gold, 1990, Ellington and Szostak, 1990). Tuerk et Gold ont réussi à sélectionner des séquences d'ARN capables de se lier à l'ADN polymérase du bactériophage T4 (gp43), à partir d'une banque d'ARN aléatoire et par une technique d'évolution moléculaire (Tuerk and Gold, 1990). Cette expérience a défini le principe de la méthode de sélection SELEX (Systematic Evolution of EXponential Enrichment). Simultanément, Ellington et Szostak ont sélectionné, selon le même principe de sélection, des séquences d'ARN capables de se lier à des colorants et ont désigné ces ligands sous le terme d'« aptamères », se référant au latin « aptus » signifiant « adapté à » et au Grec « meros » signifiant « partie » (Ellington and Szostak, 1990).

I.B. Evolution

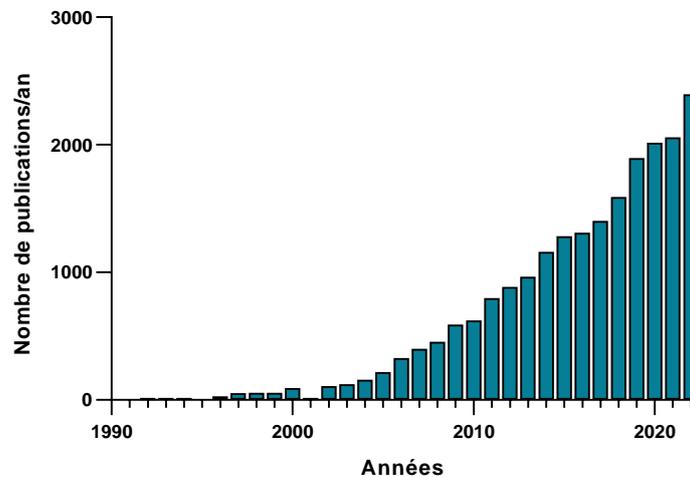


Figure 12 Evolution du nombre de publications par an sur les aptamères de 1990 à 2022 (Pubmed, 2023).

Depuis leur découverte, de nombreux aptamères ont été sélectionnés contre différentes cibles et développés principalement comme outils diagnostiques et comme outils thérapeutiques. Les protéines représentent les cibles les plus couramment utilisées des aptamères développés (Dunn et al., 2017). La **Figure 12** témoigne de l'intérêt croissant manifesté pour ce domaine de recherche, avec plus de 2,000 articles publiés en 2022.

I.C. Structure des aptamères

La structure primaire des aptamères correspond à un enchaînement de nucléotides, reliés par des liaisons phosphodiester entre le 5' et le 3' de leur ribose. Les nucléotides se composent de trois unités : un groupement phosphate, un sucre à 5 carbones (ribose pour l'ARN et désoxyribose pour l'ADN), et une base pyrimidique ou purique. Ces nucléotides sont capables d'adopter de nombreuses conformations, notamment par leur capacité à générer des liaisons chimiques non-covalentes, telles que des liaisons hydrogène, électrostatiques, ou encore de Van der Waals. Ces liaisons faibles participent à la structure tridimensionnelle de l'aptamère, en permettant l'appariement des bases complémentaires et la formation de doubles brins.

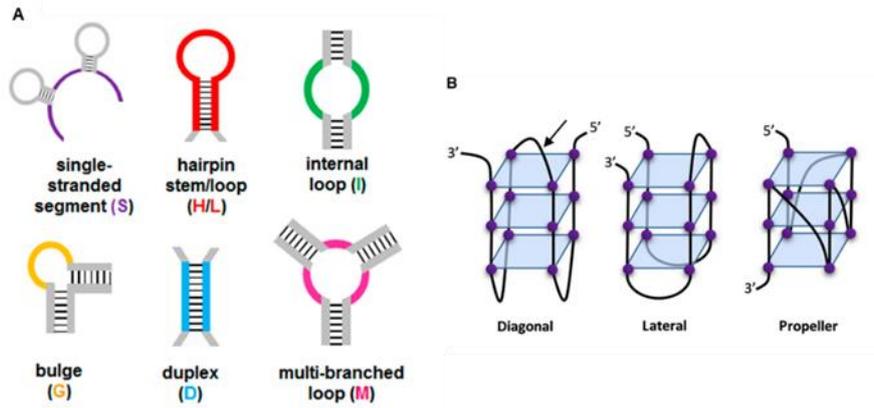


Figure 13 A: Structures secondaires de type tige-boucle, à savoir le segment simple brin (violet), la tige-boucle en épingle à cheveux (rouge), la boucle interne (vert), la boucle latérale (jaune), le duplex (bleu) et la boucle à plusieurs branches (rose) (Sullivan et al., 2019). B : Structures secondaires G-quadruplexes (ici un G3-quadruplexe) qui peuvent être de type diagonal, latéral, ou hélice (Lightfoot et al., 2019).

Les aptamères peuvent ensuite se replier sur eux-mêmes pour former des structures secondaires diverses. Les structures de type « tige-boucle » sont les plus couramment retrouvées (**Figure 13**). Les tiges correspondent à des appariements de bases complémentaires tandis que les boucles se composent de bases non appariées, sans complémentarités. La position des boucles peut varier, avec des boucles terminales (« tige-boucle »), des boucles internes, des boucles latérales (« hernie »), ... (**Figure 13A**). Les structures « G-quadruplex » sont également fréquentes et correspondent à des régions de quatre guanine assemblées dans un arrangement planaire reliés par des liaisons hydrogènes. Cette structure est polymorphe, elle peut être formée par un, deux, trois ou quatre brins (**Figure 13B**). Les directions de brins peuvent avoir diverses combinaisons et la disposition des brins peut être diagonale, latérale ou hybride (Roxo et al., 2019).

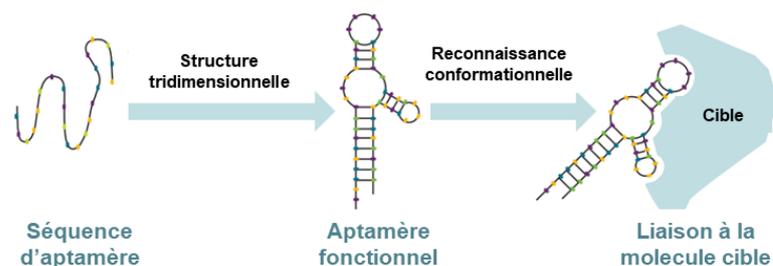


Figure 14 Représentation des aptamères et leur interaction avec la molécule cible (Nimjee et al., 2017).

Ces structures secondaires peuvent former, à leur tour, des structures tridimensionnelles uniques capables de reconnaître spécifiquement une molécule-cible spécifique. Les liaisons faibles, comme les interactions électrostatiques et hydrophobes, les liaisons hydrogène ou de Van der Waals, sont essentielles pour l'affinité et la spécificité de liaison des aptamères. Semblables à la façon dont les anticorps se lient aux antigènes, ces interactions entraînent la formation d'un complexe aptamère-cible (**Figure 14**) (Förster et al., 2011; Roxo et al., 2019).

II. La méthode de sélection des aptamères dénommée SELEX

Les aptamères sont sélectionnés à partir d'une méthode de sélection *in vitro*, dénommée SELEX (*Systematic Evolution of Ligand by EXponential Enrichment*) (Tuerk and Gold, 1990). Depuis sa découverte, des aptamères ont pu être sélectionnés contre des molécules très diverses, dont des protéines.

II.A. Le principe du SELEX traditionnel

Le SELEX est un processus de sélection *in vitro* comprenant plusieurs cycles de sélection, de séparation et d'amplification. Cette méthode commence par la génération d'une librairie d'ADN ou d'ARN simple brin, composée généralement de 10^{14} à 10^{16} séquences différentes (Shangguan et al., 2015). Chaque séquence se compose d'une région aléatoire non connue au centre et de régions constantes aux extrémités 5' et 3', permettant l'amplification par PCR.

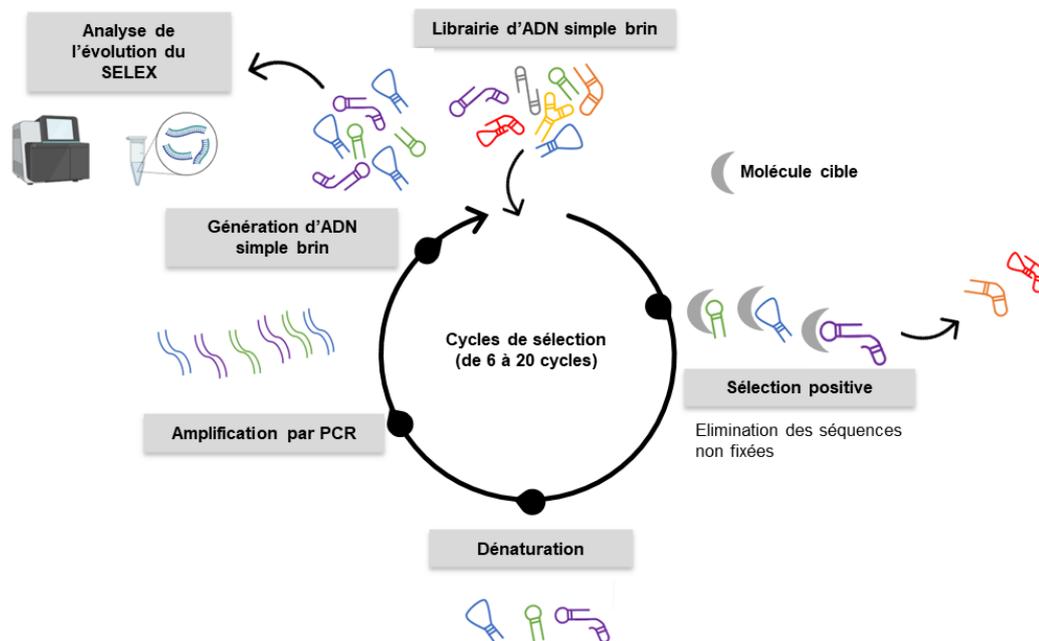


Figure 15 Les principales étapes du SELEX, dans le cas d'une sélection d'aptamères à ADN simple brin.

Cette librairie est ensuite incubée avec la molécule cible (**Figure 15**). Après incubation, les séquences ne se liant pas à la cible sont éliminées par des étapes de lavage tandis que les séquences liées à la cible sont éluées (Xu et al., 2021). Différentes méthodes de séparation existent, comme l'électrophorèse capillaire, les colonnes d'affinité, la filtration sur membrane ou encore la capture de la cible sur des billes magnétiques. Un traitement thermique est

généralement appliqué pour l'éluion des séquences fixées. Ces séquences sont ensuite amplifiées par PCR, ou par RT-PCR dans le cas d'aptamères à ARN (Xu et al., 2021). Les produits d'ADN double brin obtenus sont convertis en ARN par une étape de transcription *in vitro*. Dans le cas d'un SELEX à ADN, les produits d'ADN double brin sont convertis en ADN simple brin (Xu et al., 2021). Différentes méthodes sont disponibles, comme la PCR asymétrique, la migration sur gel en conditions dénaturantes, la purification de l'ADN sur billes de streptavidine et la digestion par la lambda exonucléase (Marimuthu et al., 2012). Le pool final d'ADN simple brin ou d'ARN est ensuite utilisé pour un nouveau tour de sélection. En général, un SELEX comprend entre 6 et 20 cycles de sélection. Au fur et à mesure de la sélection, la librairie va progressivement s'enrichir en séquences ayant une forte affinité pour la cible (Bouvier-Müller and Ducongé, 2018).

II.B. Les principales variantes du SELEX

La méthode SELEX traditionnelle nécessite plusieurs semaines à plusieurs mois de sélection et est associée à un fort taux d'échec, estimé à plus de 70% (Famulok and Mayer, 2014). De nombreuses variantes du SELEX ont vu le jour pour répondre à plusieurs objectifs : s'adapter au mieux à la molécule cible, réduire la durée de sélection et son coût et/ou améliorer les chances de réussite. Une synthèse des principales variantes du SELEX est présentée ci-dessous.

II.B.1. SELEX contre des protéines ou autres molécules purifiées

Les étapes critiques du SELEX réalisé contre des molécules purifiées sont l'étape d'immobilisation de la cible sur un support et l'étape d'éluion des séquences fixées. Plusieurs supports d'immobilisation et méthodes de séparation ont ainsi été développés.

La membrane de nitrocellulose est fréquemment utilisée pour immobiliser les protéines, de par sa capacité de liaison aux acides aminés. Cette membrane est également un support de séparation pour récupérer les séquences uniquement liées à la molécule cible. En effet, le complexe aptamère-cible est retenu par la membrane tandis que les séquences non liées sont précipitées. Le premier SELEX réalisé par Tuerk *et al.* reposait sur ce principe et a permis de sélectionner des aptamères dirigés contre l'ADN polymérase T4 (Tuerk and Gold, 1990). Cependant, cette membrane de nitrocellulose ne possède pas d'affinité pour les petites molécules non protéiques et se limite donc aux cibles protéiques (Zhuo et al., 2017).

Une autre technique d'immobilisation de la molécule cible est l'utilisation de billes magnétiques (Mag-SELEX, *magnetic bead-based SELEX*) (Bruno, 1997). Les séquences non liées à la cible

sont facilement éliminées par l'utilisation d'un séparateur magnétique. Cette méthode simple et rapide a été entièrement automatisée par l'équipe du Pr. Gunter Mayer (Université de Bonn, Allemagne), réduisant considérablement la durée de sélection (Breuers et al., 2019). Cette technique sera détaillée ultérieurement dans ce manuscrit.

Dans le cadre du CE-SELEX (*Capillary Electrophoresis SELEX*), l'étape de séparation utilise une électrophorèse capillaire. Les séquences liées sont séparées des séquences non liées, du fait de leur différence de mobilité électrophorétique. Le complexe aptamère-cible possède une mobilité plus faible par rapport aux séquences libres, permettant ainsi leur séparation (Zhuo et al., 2017). Cette méthode comporte de nombreux avantages, elle a notamment permis de sélectionner des aptamères de forte affinité tout en réduisant considérablement les cycles de sélection. Seulement 2 à 4 cycles de sélection sont nécessaires contre 20 cycles de sélection pour le SELEX traditionnel (Dong et al., 2015; Hamedani and Müller, 2016) .

Une variante du SELEX (M-SELEX, *microfluidic SELEX*) a été développée en combinant le principe du SELEX traditionnel avec un système microfluidique. Ce système utilise un thermocycleur PCR, des microlignes contenant les réactifs, un collecteur de réactifs et des vannes actionnables pour assurer la sélection et l'acheminement des échantillons (Zhuo et al., 2017). Ce système peut être combiné avec le Mag-SELEX ou encore le CE-SELEX, et réduit considérablement le temps de sélection. Cette méthode de sélection s'est montrée efficace et rapide : un aptamère a été sélectionné contre la neurotoxine botulique recombinante de type A, après un seul cycle de sélection, en combinant le M-SELEX et le Mag-SELEX (Lou et al., 2009).

Afin de faciliter la sélection d'aptamères contre des protéines ou d'autres molécules, une méthode dénommée Capture-SELEX a été développée en 2005 (Nutiu and Li, 2005). Le principe repose sur l'utilisation d'une librairie qui comporte au sein de sa séquence un domaine complémentaire à un oligonucléotide biotinylé (Lyu et al., 2021). Cette librairie est immobilisée sur des billes magnétiques de streptavidine, par interaction de ces dernières avec l'oligonucléotide biotinylé. Lors de l'incubation avec la molécule-cible, certaines séquences de l'aptamère vont s'y fixer. Le changement de conformation qui en résulte entraîne leur séparation du support et leur libération dans le surnageant. Cette méthode s'est montrée très efficace pour sélectionner des aptamères à ADN contre plusieurs antibiotiques tels que les aminoglycosides (Stoltenburg et al., 2012) et la pénicilline G (Paniel et al., 2017).

II.B.2. Cell-SELEX

Le SELEX réalisé contre des molécules purifiées ne peut s'appliquer aux protéines inconnues, insolubles ou aux protéines membranaires de structure complexe (domaines transmembranaires, protéines glycosylées ...). De plus en plus d'études ont montré que les aptamères générés lors d'un SELEX contre une protéine purifiée ne reconnaissent pas la protéine cible à son état natif (Santana-Viera et al., 2023). Le Cell SELEX permet de s'affranchir de ces obstacles, en utilisant durant la sélection des cellules vivantes entières (eucaryotes, procaryotes ou encore des parasites entiers,...) (Long et al., 2016). Les cibles moléculaires situées à la surface des cellules sont alors dans leur conformation native et cette méthode peut être utilisée pour découvrir de nouveaux biomarqueurs ou identifier des protéines de surface encore inconnues (Zhou and Rossi, 2017). Actuellement, plusieurs variantes du Cell-SELEX ont été développées, afin d'améliorer ses chances de réussite.

Le Cross-Over SELEX est une technique permettant d'obtenir des aptamères capables de reconnaître une protéine dans son état natif, avec une grande affinité et spécificité (Hicke et al., 2001). Cette technique repose sur la combinaison du Cell-SELEX et du SELEX contre la protéine purifiée. Ainsi, des aptamères hautement spécifiques ont été sélectionnés contre la ténascine-C, un des composants de la matrice extracellulaire, par des cycles de sélection à la fois sur des cellules exprimant cette protéine de surface et à la fois sur la protéine recombinante purifiée (Hicke et al., 2001).

Le Toggle SELEX est une autre variante du Cell-SELEX permettant de sélectionner des aptamères capables de reconnaître une cible présente sur différentes espèces/molécules (cellules, bactéries,...) (Shin et al., 2019). Ainsi, une étude réalisée par Shin *et al.* a permis de sélectionner des aptamères capables de reconnaître plusieurs épitopes présents sur différentes bactéries à Gram négatif. La sélection a été réalisée sur trois entérobactéries : *Escherichia coli* DH5 α , *Escherichia coli* K12 et *Serratia marcescens* (Shin et al., 2019).

Pour permettre certaines applications thérapeutiques, notamment un système de délivrance de médicaments, les aptamères nécessitent d'être internalisés dans une cellule cible. Pour cela, un protocole de sélection a été développé, nommé Cell-internalization-SELEX (Thiel et al., 2015). Le principe est d'incuber la librairie avec des cellules entières exprimant un récepteur de surface cellulaire ciblé pendant un temps d'incubation suffisant pour assurer l'internalisation des séquences liées. Par la suite, l'ARN ou l'ADN total est isolé, extrait et amplifié par PCR ou RT-PCR. Ce protocole s'est montré efficace pour la sélection d'aptamères à ARN spécifiques de deux récepteurs à activité tyrosine kinase, pouvant être utilisés pour délivrer des médicaments (Thiel et al., 2015).

Enfin, pour assurer une séparation parfaite des séquences liées aux cellules, le Cell-SELEX peut être couplé au FACS-SELEX (*Fluorescence activated cell sorting*), qui permet de contrôler le processus de sélection par cytométrie en flux (Mayer et al., 2010). Une librairie fluorescente est utilisée et les cellules marquées sont analysées au cytomètre en flux et triées.

II.B.3. SELEX *in vivo*

La liaison de l'aptamère dépend de la structure de sa cible, qui elle-même dépend notamment de l'environnement (température, contraintes stériques...). Ainsi, les aptamères sélectionnés *in vitro* peuvent ne pas fonctionner *in vivo* (Sola et al., 2020). Pour éviter ce risque et garantir la fonctionnalité des aptamères, le SELEX peut se réaliser *in vivo* afin de générer des aptamères capables de pénétrer directement dans les tissus. Pour cela, les chercheurs utilisent un modèle animal spécifique de la maladie étudiée et injectent la librairie par voie intraveineuse. Les tissus sont ensuite récupérés pour extraire et amplifier les séquences liées, pour un prochain tour de sélection. Dans le cas du cancer, cette stratégie est particulièrement intéressante étant donné que le microenvironnement tumoral est très complexe, hétérogène et multiforme (Sola et al., 2020). Cette méthode de sélection a été utilisée efficacement pour la sélection d'aptamères à ARN 2'-fluoro, résistant aux nucléases dans un modèle animal de cancer colorectal à métastases intrahépatiques. Les aptamères à ARN obtenus se sont localisés spécifiquement dans les tumeurs intrahépatiques (Mi et al., 2010). Cette variante reste très rarement utilisée car elle implique des contraintes d'entretien et pose des problèmes éthiques du fait de l'utilisation d'animaux.

II.C. Les étapes clés du SELEX

II.C.1. La librairie initiale

La librairie initiale d'acides nucléiques constitue un point crucial du SELEX qui intervient dès le départ. Lors de la conception de la librairie, il est important de choisir le type de librairie utilisée. Ainsi, les premiers protocoles de SELEX développés privilégiaient les bibliothèques à ARN. En effet, il a été démontré que l'ARN se caractérise par des structures plus complexes et fonctionnelles, donnant lieu à des ligands d'affinités plus élevées (Cheng et al., 2001). Cependant, d'autres études suggèrent que l'ADN simple brin possède une capacité comparable à l'ARN pour former des structures tertiaires complexes (Wang et al., 2019a). De toute évidence, en termes de sélection et d'applications, les aptamères à ADN possèdent des avantages par rapport aux aptamères à ARN. Premièrement, les aptamères à ADN sont chimiquement et biologiquement plus stables par rapport aux aptamères à ARN. En effet, le

groupement hydroxyle (OH) en position 2' du sucre ribose est facilement déprotoné en solution, entraînant l'hydrolyse des nucléotides d'ARN (Zhu et al., 2015). Des études ont également montré que les aptamères à ADN sont plus stables que les aptamères à ARN dans un milieu contenant 10 % de sérum de bovin ou humain (Zhu et al., 2015; Chen et al., 2017). Deuxièmement, la sélection d'aptamères à ADN est plus simple que celle des aptamères à ARN, qui nécessite une étape supplémentaire de transcription inverse. L'ADN est également moins coûteux à synthétiser que l'ARN. Par conséquent, plus de 85% des aptamères rapportés en 2013 ont été développés à partir de banques à ADN (Zhu et al., 2015; Dunn et al., 2017). Enfin, des aptamères dits artificiels composés de nucléotides modifiés chimiquement sont également développés, avec la particularité d'améliorer leur stabilité chimique et de leur apporter de nouvelles propriétés (Sefah et al., 2014). Ces modifications peuvent être ajoutées directement pendant le processus de sélection, ce qui augmente considérablement le coût du SELEX et nécessite l'utilisation de polymérases acceptant les bases modifiées. L'ajout de ces modifications après le SELEX est aussi une possibilité mais l'affinité de l'aptamère peut s'en trouver modifiée.

Un autre paramètre important est la longueur de la région aléatoire qui conditionne la diversité structurale de la banque initiale. Dans le cas d'une région aléatoire de n nucléotides, le nombre de combinaisons est de 4^n . Ainsi, plus une région aléatoire est grande, plus le nombre de séquences différentes est grand. Généralement, une librairie de 10^{14} à 10^{16} séquences différentes est utilisée pour le SELEX (Shangguan et al., 2015). Le choix de la longueur de la fenêtre aléatoire est également un paramètre important pour limiter les interactions avec les régions constantes, présentes aux extrémités (Wang et al., 2019a). Idéalement, les aptamères se lient à leur molécule cible par les structures tertiaires apportées par les nucléotides de la région aléatoire. Cependant, les motifs structurels apportés par les régions constantes peuvent prédominer et impacter la sélection. Une étude comparative utilisant différentes longueurs de régions aléatoires a montré que les aptamères avec des fenêtres aléatoires courtes avaient tendance à interagir beaucoup plus avec les régions constantes (Lozupone et al., 2003). Ainsi, généralement, les bibliothèques sont synthétisées avec une fenêtre aléatoire comprise entre 20 et 50 nucléotides avec des régions constantes de 20 nucléotides (Wang et al., 2019a).

II.C.2. Les conditions de sélection

Les conditions de sélection sont importantes pour obtenir des aptamères avec les propriétés désirées. Le tampon de sélection joue un rôle clé dans la structure de l'aptamère et les interactions avec la cible. Les tampons de sélection couramment utilisés sont les milieux de culture ou une solution saline tamponnée en phosphate (PBS). Ce tampon est le plus souvent supplémenté en cations pour limiter les charges négatives des groupements

phosphate et en ions magnésium qui apportent une stabilité structurale (Shangguan et al., 2015). Il est également important de choisir une température d'incubation qui coïncide avec l'application future des aptamères. Les températures les plus fréquemment choisies sont la température ambiante, 4°C ou 37°C. Une température de 37°C peut provoquer une internalisation des séquences en cas de Cell-SELEX et augmenter la probabilité de digestion de l'ADN par des nucléases. Une température de 4°C est recommandée dans ce cas mais certains aptamères sélectionnés à 4°C ont vu leur affinité diminuée à 37°C (Shangguan et al., 2015).

II.C.3. L'augmentation de la pression de sélection

L'objectif du SELEX est de sélectionner des aptamères de grande affinité, spécifiques et d'éviter l'amplification de séquences non spécifiques. Au début de la sélection, il est recommandé d'appliquer des conditions de sélection peu stringentes afin d'éviter la perte de séquences spécifiques (Shangguan et al., 2015). Par la suite, la pression de sélection est augmentée en modifiant certains paramètres. Ces modifications sont choisies de manière empirique par l'expérimentateur.

Pour favoriser la sélection d'aptamères de grande affinité, l'expérimentateur peut faire varier plusieurs paramètres : réduire le temps d'incubation permet de sélectionner des aptamères capables d'interagir rapidement avec leur cible ; augmenter le nombre de lavages et leur durée permet d'obtenir des aptamères capables de rester liés longtemps à leur cible ; diminuer la concentration en molécule cible permet aux aptamères de rentrer en compétition et donc de sélectionner les aptamères de plus grande affinité.

Pour obtenir des aptamères spécifiques de la cible, la composition du tampon peut être adaptée au cours du SELEX, en ajoutant des compétiteurs. Les acides nucléiques, tels que l'ARNt (ARN de transfert) ou l'ADN de sperme de saumon, sont fréquemment utilisés comme compétiteurs. Ils permettent d'éliminer les séquences peu affines pour leur cible et donc de limiter les interactions non spécifiques (Shangguan et al., 2015). L'ajout d'albumine de sérum bovin (BSA) ou de sérum au tampon de liaison permet également d'éliminer les séquences non spécifiques tout en mimant les conditions retrouvées dans des échantillons biologiques. Une autre stratégie fréquemment utilisée est l'ajout d'une étape dite de sélection négative. Dans certains SELEX, la cible est immobilisée sur un support et des séquences spécifiques au support et non à la cible peuvent s'enrichir. Pour éviter ou limiter ce problème, la librairie peut être incubée avec le support sans la cible et les séquences non fixées sont ensuite récupérées pour le reste de la sélection (Zhang et al., 2019). La sélection négative peut également consister à éliminer des séquences qui ne sont pas suffisamment spécifiques,

c'est-à-dire celles qui sont capables de reconnaître une molécule structurellement proche. Grâce à cette stratégie, des aptamères spécifiques de la théophylline ont été sélectionnés par la mise en place d'une sélection négative réalisée sur la caféine, molécule qui diffère d'un seul groupement méthyle (Jenison et al., 1994). Dans le cas d'une sélection réalisée sur des cellules, la sélection négative peut être réalisée sur des cellules différentes (saines ou n'exprimant pas les protéines ciblées...). Par exemple, des aptamères capables de reconnaître l'intégrine alpha V, un récepteur membranaire, ont été sélectionnés par l'ajout d'une sélection négative réalisée sur les cellules n'exprimant pas ce récepteur (Takahashi et al., 2016).

II.C.4. L'amplification par PCR

L'amplification par PCR est une étape incontournable du SELEX et l'un des principaux obstacles à son succès. L'amplification d'une librairie de séquences hétérogènes est particulièrement complexe, en raison de sa diversité structurale. Les séquences possèdent des propriétés structurelles différentes (teneurs en bases GC, des structures secondaires, températures de fusion...). Ainsi, des séquences s'adaptant le mieux au système PCR peuvent s'enrichir et dominer le pool final (Wang et al., 2019a). Ce phénomène entraîne une perte d'information au cours des cycles de sélection : une étude a montré que pour une seule réaction de PCR, la diversité d'une banque peut chuter jusqu'à 50% (Levay et al., 2015). Enfin, des sous-produits également appelés « PCR-by-products » peuvent venir parasiter le SELEX. Ces sous-produits peuvent se former par l'hybridation des amorces à des bases complémentaires présentes sur la région aléatoire (Tolle et al., 2014). Sans contrôle approprié, ces sous-produits peuvent dominer la composition de la librairie, entraînant l'échec du SELEX. Pour éviter ces biais, deux stratégies sont possibles : réaliser des PCR sur chaque séquence individuelle (PCR à émulsion) ou réaliser une PCR préparatoire pour déterminer le nombre optimal de cycles d'amplification à appliquer (Wang et al., 2019a).

II.C.5. La génération d'ADN simple brin

Cette étape est d'une importance primordiale pour une sélection réussie d'aptamères à ADN. L'ADN simple brin généré doit être d'une grande qualité (absence de contamination par de l'ADN double brin) et en quantité suffisante pour servir de substrat à un nouveau cycle de sélection. Pour cela, plusieurs méthodes existent comme la PCR asymétrique, la séparation des brins après migration sur gel en conditions dénaturantes, la purification de l'ADN simple brin par capture sur des billes de streptavidine et la digestion par la lambda exonucléase (Svobodová et al., 2012). Ces méthodes seront détaillées ultérieurement dans le chapitre 1.

II.D. Suivi de l'évolution du SELEX

Suivre l'évolution du SELEX est important pour adapter les conditions de sélection et pour déterminer l'arrêt du SELEX afin d'éviter de perdre des séquences spécifiques et affines. Différentes méthodes sont utilisées, soit par mesure directe de l'affinité du pool pour la cible, soit par évaluation de la diversité ou de la convergence des séquences. Les mesures directes d'affinité sont peu sensibles en raison de la présence d'une grande proportion de séquences aléatoires.

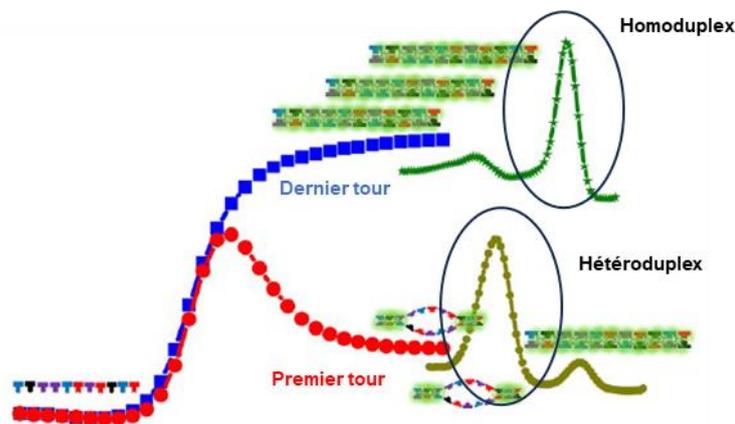


Figure 16 Evolution des courbes d'amplification et de fusion au cours du SELEX (Luo et al., 2017).

Luo *et al.* ont proposé une analyse des courbes d'amplification et de fusion par PCR quantitative pour observer l'évolution de la diversité des séquences au cours du SELEX (Luo et al., 2017). En effet, le profil des courbes d'amplification change au cours de la sélection (**Figure 16**). Au cours des premiers cycles de sélection, une baisse de fluorescence est observée du fait d'une forte proportion de séquences aléatoires et non spécifiques, créant des appariements instables. Au fur et à mesure de la sélection, la diversité de la librairie diminue et le mésappariement est donc réduit, par conséquent la baisse de fluorescence n'est plus observée (**Figure 16**). L'analyse des courbes de fusion fournit une preuve supplémentaire de l'enrichissement de séquences (**Figure 16**). La température de fusion dépend des structures internes et de la stabilité des duplexes formés. La formation de composés instables ou hétéroduplex se caractérise par des températures de fusion plus faibles que celle des composés stables dits homoduplex. Au début de la sélection, les composés hétéroduplex sont majoritaires en raison de la grande diversité des séquences. Au fur et à mesure de la sélection, les composés homoduplex augmentent et prédominent, en raison de la baisse de diversité et donc d'une réduction des mauvais appariements. Cette méthode de suivi possède de nombreux avantages (peu coûteuse et rapide) et s'est avérée efficace dans d'autres études (Kolm et al., 2020).

Enfin, un suivi des banques au fur et à mesure des cycles de sélection peut être réalisé par séquençage à haut débit (Quang et al., 2016). Ce suivi permet d'observer un enrichissement des séquences et de comparer l'enrichissement en fonction des conditions de sélection appliquées.

II.E. Identification des séquences

Au cours ou à la fin de la sélection, les séquences obtenues à chaque tour sont identifiées par séquençage à haut débit. Auparavant, seules les séquences du dernier tour de sélection pouvaient être identifiées par séquençage Sanger, après clonage dans un système d'expression. Cette technique de clonage était fastidieuse et ne permettait pas de suivre l'évolution des séquences au cours du SELEX.

Récemment, la technologie de séquençage à haut débit a été introduite dans la procédure SELEX (HTS-SELEX, *High-throughput sequencing SELEX*). Cette technologie est capable d'analyser des millions de séquences de tous les cycles de sélection. Ainsi, l'enrichissement des séquences peut être observé beaucoup plus tôt, réduisant la durée de sélection (Zhuo et al., 2017; Komarova et al., 2020). Le séquençage à haut débit possède de nombreux avantages. Il permet de détecter des séquences enrichies dans de très faibles proportions (<1%), d'identifier et d'observer l'enrichissement de motifs structuraux conservés participant probablement à la liaison avec la cible, d'identifier les meilleurs variants (Quang et al., 2016). Un logiciel Patternity-seq a été développé par la plateforme MIRcen (*Molecular Imaging Research Center*) du CEA (Centre commissariat à l'énergie atomique) pour l'analyse de ces données (Quang et al., 2016). Ce logiciel aide les expérimentateurs à choisir les meilleurs candidats aptamères pour caractériser par la suite leur affinité et leur spécificité. Tout d'abord, la fréquence de chaque séquence est mesurée pour chacun des tours SELEX. Ces séquences sont ensuite rassemblées en famille, selon leur similitude nucléotidique. Les fréquences des séquences appartenant à une même famille sont additionnées pour obtenir la fréquence de la famille en question. Un score d'évolution est ensuite attribué par famille. Les séquences choisies pour les études d'affinité sont des séquences majoritaires et issues de familles très enrichies.

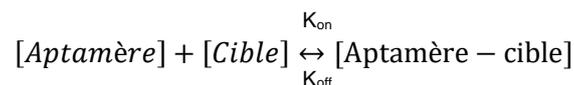
II.F. Caractérisation des candidats aptamères

Après l'étape de sélection et l'analyse par séquençage, l'affinité et la spécificité des aptamères choisis sont étudiées. Il est essentiel de caractériser leurs propriétés de liaison avant de développer leurs applications futures. La caractérisation des aptamères repose

principalement sur l'étude de leur affinité, spécificité et sensibilité à différentes conditions (températures, sérum, ...).

II.F.1. Notion d'affinité

L'étude de l'affinité des candidats aptamères consiste à mesurer la constante d'équilibre de dissociation, dénommée K_d , allant du picomolaire (pM) au nanomolaire (nM) (Quang et al., 2016). Un équilibre de liaison simple avec une stœchiométrie de 1:1 est décrit par la formule suivante :



avec K_{on} , constante d'association et K_{off} , constante de dissociation. La vitesse d'association V_{on} et la vitesse de dissociation V_{off} se définissent par les formules suivantes :

$$V_{on} = K_{on} \times [A] \times [C] \text{ et } V_{off} = K_{off} \times [AC]$$

Lorsque la réaction est à l'équilibre, les vitesses d'association et de dissociation sont égales. La stratégie la plus courante pour mesurer le K_d consiste à faire varier la concentration de l'aptamère tout en conservant une concentration en cible constante. Dans ce cas, la concentration de l'aptamère est très supérieure à celle de la cible, donc $[A] \gg [C]$ et $[C_{tot}]$ est la concentration totale de la cible (Quang et al., 2016).

$$K_{on} \times ([C_{tot}] - [AC]) \times [A] = K_{off} \times [AC]$$

Cet équilibre se décrit par une constante de dissociation K_d , définie par la formule ci-dessous :

$$K_d = \frac{K_{off}}{K_{on}} = \frac{([C_{tot}] - [AC])}{\left(\frac{[A]}{[AC]}\right)}$$

$$[AC] = [C_{tot}] \times \frac{[A]}{([A] + K_d)}$$

En traçant la concentration du complexe aptamère-cible en fonction de la concentration en aptamère, une courbe hyperbolique est obtenue et correspond à l'affinité totale (**Figure 17**).

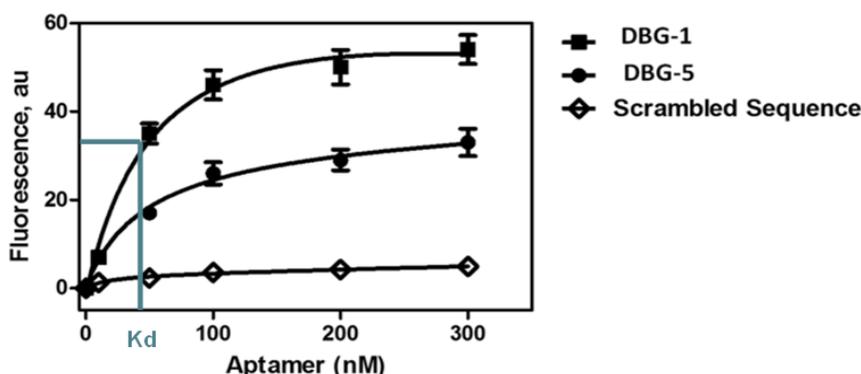


Figure 17 Exemple de résultats d'affinité obtenus pour des aptamères sélectionnés contre la fluorescéine (Aljohani et al., 2018). Ces données représentent les courbes de liaison totale du ligand et de la séquence scramble pour la molécule cible.

Pour mesurer le K_d , l'utilisation d'une séquence scramble est fortement recommandée (Quang et al., 2016). Le scramble est une séquence choisie aléatoirement mais qui possède les mêmes régions constantes que les candidats aptamères. Cette séquence n'a donc pas été sélectionnée au cours du SELEX. Elle permet d'évaluer la présence d'interactions non spécifiques que peut posséder une séquence quelconque avec la molécule cible. La courbe d'affinité spécifique d'un aptamère est donc obtenue en soustrayant les valeurs obtenues pour le scramble. A partir de cette courbe, est estimé le K_d , qui correspond à la concentration en aptamère à laquelle 50% des molécules cibles lui sont liées. Ainsi, plus le K_d d'un aptamère est faible, meilleure est l'affinité.

II.F.2. Les différentes méthodes de mesure de l'affinité

Pour étudier l'affinité, l'expérimentateur a le choix entre plusieurs méthodes de mesure. Certaines méthodes nécessitent une étape de marquage de l'aptamère ou une immobilisation post-sélection, pouvant impacter la liaison et biaiser les résultats d'affinité. Afin de choisir la méthode optimale, l'expérimentateur doit prendre en compte la quantité de cibles nécessaires, le coût, la disponibilité des méthodes et la durée d'analyse (Jing and Bowser, 2011).

Ces méthodes sont regroupées suivant trois grands principes : les méthodes de séparation, les méthodes de fluorescence et les méthodes ne nécessitant pas de marquage. Les méthodes de séparation consistent à séparer l'aptamère libre des complexes aptamère-cible. Un marquage de la cible ou de l'aptamère permet de quantifier la fraction liée ou libre. Ces méthodes de séparation comprennent principalement la dialyse, l'ultrafiltration ou la migration sur gel électrophorétique (Jing and Bowser, 2011). Leurs principes, avantages et

inconvénients sont résumés dans le **Tableau 3**. D'autres méthodes de séparation existent comme l'électrophorèse capillaire ou encore l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Jing and Bowser, 2011). Ces méthodes permettent de mesurer l'affinité des candidats aptamères contre une molécule ou une protéine purifiée.

Tableau 3 Principes, avantages et inconvénients des méthodes de séparation les plus utilisées pour mesurer l'affinité des aptamères contre des molécules purifiées (Jing and Bowser, 2011).

Méthode de séparation	Principes	Avantages	Inconvénients
Dialyse	Séparation par une membrane semi-perméable Passage de l'aptamère libre à travers la membrane Détermination de la concentration dans les deux compartiments	Simple	Longue durée d'incubation Volume important Adsorption non spécifique
Ultrafiltration	Même principe que la dialyse Utilisation d'une membrane filtrante (nitrocellulose) Marquage radioactif de l'aptamère ou de la cible	Rapidité, faible coût et sensibilité	Adsorption non spécifique à la membrane Equipement radioactif, contraintes de sécurité, réglementation
Migration sur gel électrophorétique	Migration sur gel de polyacrylamide ou agarose Différence de migration entre l'aptamère libre et le complexe Quantification en utilisant l'absorbance UV, le marquage radioactif des acides nucléiques ou la coloration au bleu de Coomassie	Sensibilité élevée, faible coût et diverses méthodes de détection	Temps

Les méthodes de fluorescence sont avantageuses puisque le K_d peut être mesuré dans différents tampons, contrairement aux méthodes de séparation pour lesquelles un changement de tampon peut affecter la liaison du complexe à une membrane de nitrocellulose par exemple. Ces méthodes sont également plus rapides et une grande diversité de fluorophores est disponible. La cytométrie en flux ou FACS est principalement utilisée pour étudier l'affinité des aptamères contre des cellules. Cette méthode mesure l'intensité de fluorescence du complexe aptamère-cible (Jing and Bowser, 2011). Une autre méthode basée sur la mesure de fluorescence par polarisation est utilisée et repose sur le principe suivant : lorsqu'un aptamère se lie à sa cible, le volume molaire change et une augmentation de la polarisation est observée. L'analyse de ces changements permet ainsi de mesurer la quantité de complexe formé en fonction d'une concentration croissante en aptamère (Jing and Bowser, 2011).

Enfin, certaines méthodes ne nécessitent pas de marquage et regroupent la technique de résonance plasmonique de surface ou SPR (*Surface Plasmon Resonance*) et la calorimétrie de titrage isotherme ou ITC (*Isothermal titration calorimetry*). Dans le cas de la technique SPR, l'aptamère est immobilisé sur une surface métallique. Lors de l'injection de la cible, la liaison

aptamère-cible modifie l'indice de réfraction et le signal de résonance augmente. Par la suite, un tampon dénaturant est introduit et permet la dissociation du complexe formé. Cette technique rapide et sensible permet de mesurer le K_d à l'équilibre et les constantes d'association et de dissociation. Cependant, cette technique est coûteuse et demande une quantité de cible importante. L'immobilisation de l'aptamère sur la surface métallique peut également affecter son affinité pour la cible (Chang, 2021). L'ITC est une méthode alternative et très précise, elle s'appuie sur le principe que la formation du complexe aptamère-cible est une réaction exothermique qui dégage de la chaleur (Jing and Bowser, 2011). Une concentration fixe d'aptamère est contenue dans une cellule et des concentrations croissantes de protéines sont injectées. La formation de complexe aptamère-cible va induire une libération de chaleur, à mesure que les concentrations en cible augmentent. La quantité d'énergie électrique nécessaire pour maintenir la chaleur dans la cellule est mesurée et permet d'étudier l'affinité. Cette technique est sensible mais reste coûteuse, les formules sont complexes et nécessitent la formation du personnel. De plus, la chaleur peut être produite lors de l'injection de la cible ou par la formation de bulles dans la cellule, ces phénomènes peuvent donc biaiser les mesures de K_d (Jing and Bowser, 2011).

II.F.3. Notion de spécificité

La spécificité des candidats aptamères correspond à la capacité à se lier à une cible unique et est évaluée en testant les candidats aptamères contre des molécules différentes ou homologues.

III. Les forces et les faiblesses des aptamères

III.A. Comparaison avec les anticorps monoclonaux

Les aptamères sont souvent considérés comme des "anticorps chimiques" avec des avantages significatifs en termes de stabilité, de synthèse et de non-toxicité (Zhou and Rossi, 2017). La comparaison de ces deux molécules est présentée dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 Comparaison des anticorps monoclonaux et des aptamères (Niederlender et al., 2021).

	Anticorps monoclonaux	Aptamères
Composition	Protéines	Acides nucléiques simple brin (ADN ou ARN)
Poids moléculaire	140-700 kDa	6-30 kDa
Méthode de production	<p><u>Méthode par hybridome :</u> Longue (plusieurs mois), utilisation d'animaux de laboratoire</p> <p><u>Méthode par phage display :</u> Rapide, production <i>in vitro</i> (banque naïve)</p> <p><u>Pour les deux méthodes :</u> Coûteuses, contraintes techniques, contamination potentielle (animaux, phages, ...), difficilement transposable à grande échelle</p>	<p><u>Méthode de sélection SELEX :</u> Rapide, sélection <i>in vitro</i>, peu de risques de contamination, transposition à grande échelle possible</p>
Reproductibilité	Variabilité entre les lots	Grande reproductibilité, pas de variabilité d'un lot à l'autre
Stabilité	<p>Durée de conservation limitée, instable</p> <p>Sensible à la température, dénaturation irréversible, usage unique</p>	<p>Longue durée de conservation et stabilité</p> <p>Stabilité physique et thermique : résistant à haute température, dénaturation réversible, réutilisable</p>
Immunogénicité	Oui	Non
Cibles	Seulement les molécules immunogènes	Tous type de cibles
Pharmacocinétique	<p>Accès limité à de nombreux compartiments biologiques</p> <p>Résistants aux nucléases et à la filtration rénale</p> <p>Longue durée de vie</p> <p>Peu de possibilités pour améliorer la pharmacocinétique</p>	<p>Internalisation possible dans les compartiments biologiques</p> <p>Sensibles à la filtration rénale et aux nucléases</p> <p>Durée de vie courte</p> <p>Plusieurs améliorations possibles pour améliorer la pharmacocinétique</p>
Modification chimique	Modifications chimiques limitées, non spécifiques et inconstantes	Grande variété de modifications chimiques qui peuvent être réalisées pendant ou après la sélection
Antidote	Non	Oui, par une séquence complémentaire à l'aptamère

Comme mentionné précédemment, la production d'anticorps monoclonaux recombinants peut se réaliser par la méthode phage display. Cette méthode repose sur l'insertion de séquences de gènes codant pour un anticorps (région variable) dans la séquence d'ADN d'un bactériophage filamenteux, qui peut être exprimé à la surface de la capsid du bactériophage (Frenzel et al., 2016). Le phage modifié infecte ensuite *E. coli* pour produire rapidement un grand nombre d'anticorps. Une banque de phage naïfs ou immuns est constituée et peut être utilisée pour la découverte d'anticorps spécifiques d'épitopes d'un antigène cible, par des méthodes de criblage *in vitro* (Frenzel et al., 2016). Cette méthode possède plusieurs avantages comparés à la méthode traditionnelle fondée sur l'obtention d'hybridomes, puisqu'elle permet d'éviter l'utilisation d'animaux. Une fois qu'une banque d'anticorps est établie, un anticorps recombinant peut être produit en huit semaines (Hammers and Stanley, 2014; Frenzel et al., 2016). A partir de l'anticorps produit, il est possible de choisir l'isotype

(selon l'espèce animale souhaitée) et la classe d'anticorps (IgA, IgM, IgG) souhaités, en ajoutant le domaine constant approprié. Cependant, cette méthode est très coûteuse, et est une technologie complexe, exigeante et chronophage (Stanley, 2014). Enfin, l'appariement des chaînes lourdes et légères peut ne pas refléter celui de l'immunoglobuline *in vivo* (Stanley, 2014).

Le premier avantage des aptamères concerne leur méthode de sélection. La méthode de sélection *in vitro* des aptamères (SELEX) est rapide (plusieurs semaines à quelques mois) et peut être a priori considérée comme moins coûteuse que les méthodes de production des anticorps monoclonaux (Niederlender et al., 2021). De plus, de nombreuses variantes de la méthode SELEX ont été développées, réduisant considérablement le temps de la sélection. La synthèse d'aptamères une fois sélectionnés est associée à un risque de contamination très faible, comparé à la production d'anticorps monoclonaux (utilisation d'animaux ou de phages, bactéries...). En effet, une fois sélectionnés, les aptamères sont directement synthétisés chimiquement avec une grande reproductibilité, facilitant une transposition à grande échelle (Keefe et al., 2010).

Deuxièmement, les aptamères sont tolérants au pH et thermostables (Thiviyathan and Gorenstein, 2012). Leur dénaturation thermique est réversible, ils peuvent retrouver leur conformation suite à un changement de température. Cet avantage significatif facilite leur utilisation répétée et leur stockage. La faible stabilité et l'immunogénicité des anticorps constituent un obstacle majeur à leur commercialisation. Contrairement aux anticorps, les aptamères sont considérés comme non immunogènes. Actuellement, aucune étude n'a démontré une activation du système immunitaire suite à leur utilisation (Kovacevic et al., 2018).

Enfin, les anticorps et les aptamères peuvent se lier à une cible avec une haute affinité et une spécificité élevée. Cependant, les cibles des anticorps sont nécessairement immunogènes. Au contraire, les cibles des aptamères sont très diverses, allant de la petite molécule (ions, peptides...), à des molécules complexes (protéines, carbohydrates, lipides...), voire à la cellule eucaryote ou procaryote. Les aptamères sont également capables de distinguer des molécules structurellement très proches (Lipi et al., 2016). Il a été démontré qu'un aptamère développé contre la théophylline présentait une affinité 10 000 fois supérieure pour celle-ci que pour la caféine, qui diffère de la théophylline par un seul groupement méthyle (Jenison et al., 1994). Les aptamères peuvent également distinguer des molécules sous différentes conformations. C'est le cas d'un aptamère énantiosélectif capable de différencier la L-arginine de la D-arginine (Geiger et al., 1996).

Malgré ces nombreux avantages, les anticorps dominent fortement dans les domaines thérapeutiques et diagnostiques. Une des explications est que les aptamères sont des outils plus récemment développés. Le SELEX est moins maîtrisé et nécessite de former le personnel. De plus, la technologie des aptamères souffre de certains inconvénients majeurs, comme la sensibilité des aptamères aux nucléases et leur dégradation rapide dans la circulation, ce qui limite leur utilisation en thérapeutique. En 2004, la FDA (*Food-Drug Administration*) a autorisé le premier aptamère à ARN commercialisé pour traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Il s'agit du pegaptanib (Macugen®, produit par EyeTech et Pfizer) ciblant spécifiquement le facteur de croissance VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Actuellement, ce médicament n'est plus commercialisé, une des raisons évoquées par le fabricant étant le développement d'inhibiteurs du VEGF plus efficaces (Haute autorité de santé, 2021). Un second aptamère thérapeutique, l'avacincaptad pegol, a été approuvé par la FDA en septembre 2023 pour le traitement de l'atrophie géographique secondaire causée par la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

III.B. Limites des aptamères

Tout d'abord, une affinité et une spécificité insuffisantes peuvent limiter les applications futures d'un aptamère. Un faible K_d et une forte spécificité sont indispensables pour des applications thérapeutiques, diagnostiques et de délivrance de médicaments (Röthlisberger and Hollenstein, 2018). Certaines cibles sont complexes et obtenir des aptamères très affins est donc difficile, c'est le cas notamment pour les glycoprotéines, les énantiomères et les petites molécules organiques. Les aptamères qui reconnaissent des cibles particulières peuvent également se lier à des molécules dont la structure est similaire. Une réactivité croisée peut donc être un obstacle à une application diagnostique et thérapeutique, en raison de l'interaction possible avec d'autres protéines (Keefe et al., 2010). Cependant, ce problème peut être évité en introduisant une étape de sélection négative durant le SELEX avec des molécules structurellement similaires (Keefe et al., 2010).

Un autre inconvénient des aptamères est lié à leur méthode de sélection, qui a longtemps été protégée par des titres de propriété intellectuelle. La méthode SELEX semble être un protocole assez simple, mais il s'agit en réalité d'un processus long et fastidieux qui est associé à un taux d'échec élevé, estimé à plus de 70% (Famulok and Mayer, 2014).

Par rapport aux anticorps monoclonaux, les aptamères manquent également de diversité chimique (Chan et al., 2022). Les anticorps sont constitués de 20 acides aminés diversifiés, ils peuvent donc être hydrophobes, hydrophiles, chargés ou non, et peuvent utiliser plusieurs

types d'interactions pour se lier à leur cible (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes, force de Van der Waals...). Les aptamères sont quant à eux chargés négativement et hautement hydrophiles et forment principalement des interactions ioniques et des liaisons hydrogène (Chan et al., 2022).

Enfin, l'inconvénient majeur des aptamères est leur dégradation rapide par les nucléases dans les milieux biologiques, tels que le sang. Le temps moyen de dégradation d'oligonucléotides dans le sang varie de quelques minutes à plusieurs dizaines de minutes, en fonction de la concentration et de la structure tridimensionnelle de l'oligonucléotide (Keefe et al., 2010). Leur demi-vie dans le sang est donc très courte. La plupart des aptamères se composent de 20 à 100 nucléotides avec un poids moléculaire compris entre 6 et 30 kDa (Röthlisberger and Hollenstein, 2018). De ce fait, les aptamères sont capables de traverser les barrières biologiques et se distribuent rapidement et largement dans le plasma et les tissus. Cependant, les aptamères sont facilement filtrés par le glomérule rénal, qui élimine de la circulation sanguine les substances d'un poids moléculaire inférieur à 30-50 kDa. Leur biodisponibilité est donc limitée, ce qui représente un inconvénient majeur pour des applications thérapeutiques *in vivo* (Keefe et al., 2010). Ces limites peuvent être surmontées par l'utilisation de bases modifiées, mais il s'agit d'une technologie innovante, encore peu répandue dans le domaine des aptamères.

III.C. Modification des aptamères

Les limites des aptamères, liées à leur nature, peuvent être dépassées grâce à l'insertion de modifications chimiques (Chan et al., 2022). Ces modifications peuvent se réaliser au niveau du squelette phosphate, du sucre ou encore des bases, avant ou après la sélection (Chan et al., 2022). Les principales modifications sont présentées dans cette partie.

Une résistance aux nucléases peut être conférée par la modification du squelette phosphate par un α -triphosphate, correspondant au remplacement d'un atome d'oxygène par un atome de soufre sur le phosphore α du nucléotide triphosphate (Röthlisberger and Hollenstein, 2018). Les modifications du sucre visent également à rendre les aptamères résistants aux nucléases, elles interviennent le plus souvent en position 2' du ribose, en ajoutant un groupement amine NH₂ (2'-NH₂), le fluor F (2'-fluoro) ou encore le méthoxyle OCH₃ (2'-OMe). Les progrès de l'évolution enzymatique ont permis d'identifier des polymérases capables d'accepter des nucléotides modifiés, avec des substituants en position 2' (Chan et al., 2022). Ainsi, Kubik *et al.* ont sélectionné des aptamères contre l'interféron gamma, à partir de banques d'ARN modifiés en 2'fluoro pyrimidiques et/ou 2'amino pyrimidiques (Kubik et al.,

1997). En conséquence, la demi-vie des aptamères modifiés a été portée à quelques heures, alors que l'aptamère non modifié était caractérisé par une demi-vie de seulement 20s dans du sérum humain (Lipi et al., 2016).

D'autres modifications visant à réduire la filtration rénale consistent à ajouter une molécule de taille importante afin d'augmenter la masse moléculaire de l'aptamère et d'éviter son élimination par les reins (Keefe et al., 2010). La modification la plus courante consiste en l'ajout de polyéthylène glycol (PEG). Le polyéthylène glycol est une molécule soluble dans l'eau et non dégradable, qui peut être attachée de manière covalente aux aptamères en 3' ou 5' sans altérer leur liaison et en les protégeant de la filtration rénale. D'autres alternatives comme la conjugaison de l'aptamère avec des molécules de cholestérol, des liposomes,... permettent de prolonger la durée de vie des aptamères dans la circulation sanguine (Keefe et al., 2010) .

Ces modifications peuvent également être combinées. Le meilleur exemple d'aptamère modifié pour une application thérapeutique est celui de l'aptamère pegaptanib (Macugen®). Cet aptamère à ARN a été obtenu en utilisant des bases pyrimidiques modifiées en 2'-fluoro et des bases puriques non modifiées. Après sa sélection, les bases puriques ont été modifiées en 2'-OMe. Une molécule de PEG de 40 kDa a ensuite été ajoutée en 5' et sa séquence a été complétée par un résidu de désoxythymidine en 3', afin de réduire sa filtration rénale. En conséquence, la demi-vie de cet aptamère a été prolongée jusqu'à 131h (Shigdar et al., 2013).

Les Spiegelmers sont des aptamères d'acide L-ribonucléique. Il s'agit d'image miroir des oligonucléotides naturels et sont très résistants à la dégradation des nucléases, en raison de leurs L-nucléotides. Trois Spiegelmers développés par NOXXON Pharma font l'objet d'essais cliniques pour le traitement de la leucémie lymphoïde (NOX-A12), de l'anémie chronique chez les patients atteints de cancer (NOX-H94) et du diabète de type 2 ou du cancer du foie ou du pancréas (NOX-E36) (Gold et al., 2012, Steurer et al., 2019). Ces essais cliniques semblent toujours en cours.

L'utilisation de bases artificielles (dUTP,...) permet de conférer de nouvelles conformations secondaires et tertiaires (Diafa and Hollenstein, 2015). L'ajout d'une chaîne latérale via une liaison C5-amide sur les bases azotées est une modification permettant d'obtenir des aptamères caractérisés par une faible vitesse de dissociation, commercialisés sous le nom de SOMAmers (*Slow off-rate modified aptamers*) (Kumar Kulabhusan et al., 2020). Une autre modification possible est l'ajout d'un groupement indole hydrophobe par la méthode de sélection Click-SELEX. Cette modification permet d'améliorer les chances de sélectionner des aptamères contre des protéines complexes (Gold et al., 2010).

IV. Les principales applications des aptamères

Depuis leurs découvertes, les aptamères ont été utilisés dans de nombreux domaines scientifiques, principalement en tant qu'outils de détection et de diagnostic, thérapeutiques ou de bioimagerie (**Figure 18**).

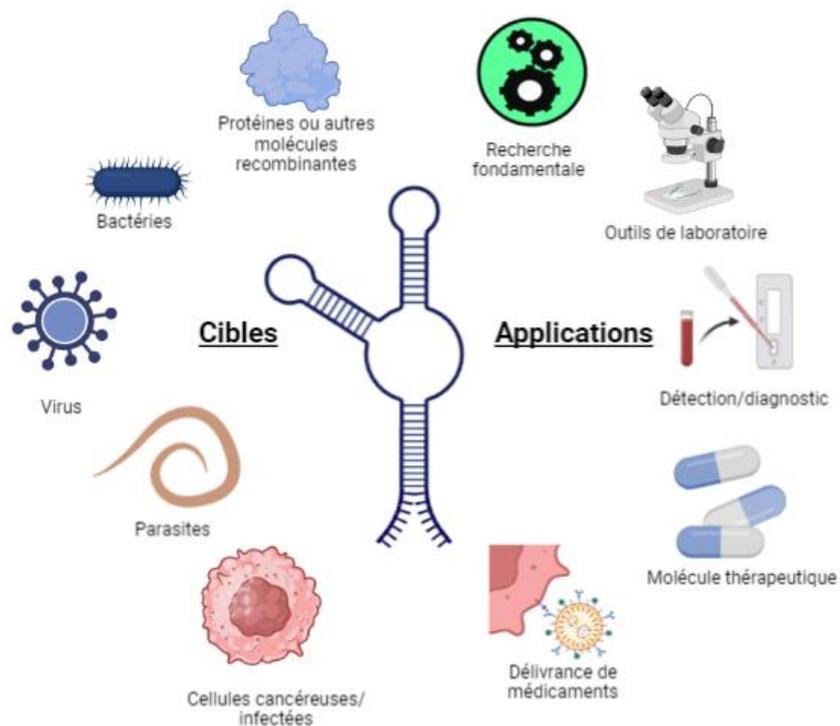


Figure 18 Les principales applications des aptamères.

IV.A. Les aptasensors et leurs applications en diagnostic

Une fois sélectionnés, les aptamères peuvent être utilisés pour la reconnaissance moléculaire de leurs cibles. L'affinité et la spécificité élevées des aptamères en font des biosenseurs idéaux, capables de remplacer les anticorps conventionnels en recherche, pour le diagnostic clinique, ainsi que pour la sécurité environnementale et alimentaire (recherche de toxines, de contaminants comme les métaux lourds, d'agents pathogènes...) (McConnell et al., 2020; Schmitz et al., 2020).

IV.A.1. Les aptasensors

IV.A.1.i. Les différentes configurations

Un biocapteur typique se compose de deux éléments : un élément de reconnaissance et un transducteur de signal qui peut être fluorescent, électrochimique, colorimétrique... Les biocapteurs utilisant les aptamères comme élément de reconnaissance se dénomment « aptasensors » et peuvent présenter plusieurs configurations (**Figure 19**) (Prante et al., 2020).

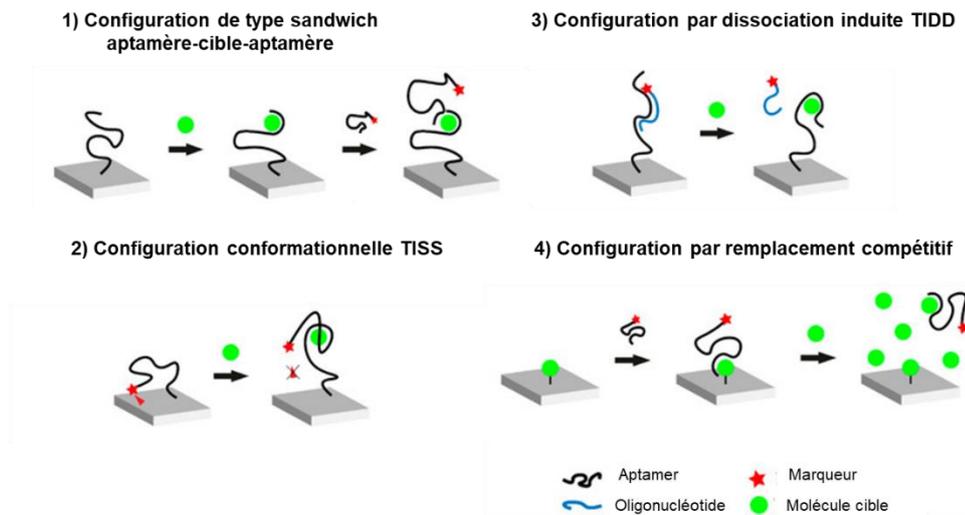


Figure 19 Les différentes configurations possibles des aptasensors (Prante et al, 2020).

Une construction de type sandwich implique une détection avec deux composants : soit deux aptamères, soit un aptamère et un anticorps (**Figure 19-1**). Cette configuration hybride est possible quand la cible possède au moins deux sites de liaison (Prante et al., 2020). Un aptamère ou un anticorps est immobilisé sur une surface et va capturer la cible, tandis qu'un autre aptamère/anticorps va se lier à la cible sur un site de liaison différent pour assurer la détection. Ces systèmes sont difficilement applicables aux petites molécules, leur surface de reconnaissance étant limitée (Prante et al., 2020). Une autre option possible se fonde sur le changement conformationnel induit par la cible et se dénomme « TISS » (*target-induced structure switching*) (**Figure 19-2**). Ce système utilise la capacité de l'aptamère à se replier dans une structure tridimensionnelle spécifique lors de la liaison à sa cible. Lors de l'ajout de la molécule cible, l'aptamère subit des réarrangements structuraux, ce qui modifie alors la position de l'élément signal conjugué à l'aptamère et permet l'émission de fluorescence (Prante et al., 2020). La configuration basée sur la dissociation induite par la cible ou TIDD (*target-induced dissociation/displacement*) repose également sur les propriétés structurales de l'aptamère (**Figure 19-3**). Cependant, le changement de conformation de l'aptamère n'est pas suivi directement, c'est le déplacement d'un oligonucléotide complémentaire qui est

déecté. Cet oligonucléotide est conçu pour se lier au site de liaison aptamère-cible à un endroit où les changements structuraux sont importants. Lors de la liaison à la cible, cet oligonucléotide est déplacé et entraîne un changement de signal, assurant la détection (Prante et al., 2020). Enfin, une configuration basée sur le principe du remplacement compétitif est possible (**Figure 19-4**). Ce système consiste à utiliser une molécule immobilisée qui entre en compétition avec la molécule cible libre. La liaison de l'aptamère à la molécule cible étant de plus forte affinité, l'aptamère marqué ne peut donc pas se fixer sur la molécule immobilisée (Prante et al., 2020).

IV.A.1.ii. Une multiplicité de transducteurs

Il existe plusieurs types de transducteurs, regroupés en quatre principaux groupes : les transducteurs optiques, électrochimiques, calorimétriques et piézoélectriques (Prante et al., 2020).

Les transducteurs optiques sont les plus couramment utilisés et se fondent sur diverses propriétés optiques, comme la fluorescence, la colorimétrie, la bioluminescence... (Hong et al., 2012). Dans le cas d'aptasensors basés sur la fluorescence « signal-on », un aptamère est conjugué à un fluorophore qui en l'absence de la cible est éteint par un quencher. Lors de la reconnaissance de la cible, un changement de conformation va libérer le fluorophore, ce qui induit un signal quantifiable (Brosseau et al., 2023). Dans le cas d'aptasensors colorimétriques, la détection des analytes est observée par un changement de couleur. Les sondes colorimétriques les plus utilisées sont les nanoparticules, capables d'induire des changements de couleur sous différentes conditions. La reconnaissance de la cible va entraîner une agrégation des nanoparticules conjuguées à l'aptamère. Cette agrégation des particules entraîne un changement de couleur visible à l'œil nu ou par des instruments optiques (Brosseau et al., 2023). Enfin, des aptasensors utilisant la fibre optique sont également développés en raison de leurs propriétés uniques. Ils utilisent le principe d'absorbance, d'indice de réfraction ou de diffusion de la lumière comme techniques de transduction. Par exemple, l'usage des biocapteurs SPR préparés à l'aide de fibres optiques est une technologie puissante qui mesure les changements d'indice de réfraction suite à la reconnaissance de la cible (Brosseau et al., 2023). Ce type d'aptasensors a permis de détecter avec succès des contaminants environnementaux, des antibiotiques, des biomarqueurs de maladies et des virus (Brosseau et al., 2023).

Les transducteurs électrochimiques ont pour principe d'immobiliser les aptamères à la surface d'une électrode, le plus souvent par liaison covalente. La liaison à l'analyte est observée sur la base de variations électrochimiques, comme la voltamétrie ou la potentiométrie (Radi and

Abd-Ellatief, 2021). La transduction électrochimique offre des avantages comme une sensibilité élevée et un faible coût de production car elle ne nécessite pas d'instruments optiques coûteux (Radi and Abd-Ellatief, 2021).

Les réactions catalysées par les enzymes étant généralement exothermiques, ces dégagements de chaleur peuvent être mesurés par des transducteurs calorimétriques (Prante et al., 2020). Enfin, les transducteurs piézoélectriques sont basés sur les changements de poids moléculaire lors de la liaison à la cible et sont moins fréquents (Prante et al., 2020).

IV.A.2. Quelques exemples d'applications

Depuis l'introduction du premier aptasensor électrochimique détectant la thrombine, leur application s'est étendue principalement au diagnostic des maladies infectieuses et parasitaires, ainsi qu'au diagnostic de tumeurs (Chandola et al., 2016). Quelques exemples sont présentés ci-dessous afin de montrer le potentiel important des aptamères dans ce domaine.

IV.A.2.i. Bactéries

De nombreux aptamères avec des affinités et spécificités élevées ont été sélectionnés contre des bactéries entières pour détecter les infections bactériennes. Ainsi, Chen *et al.* ont développé un aptasensor fluorimétrique pour la détection de *Staphylococcus aureus* (Chen et al., 2022).

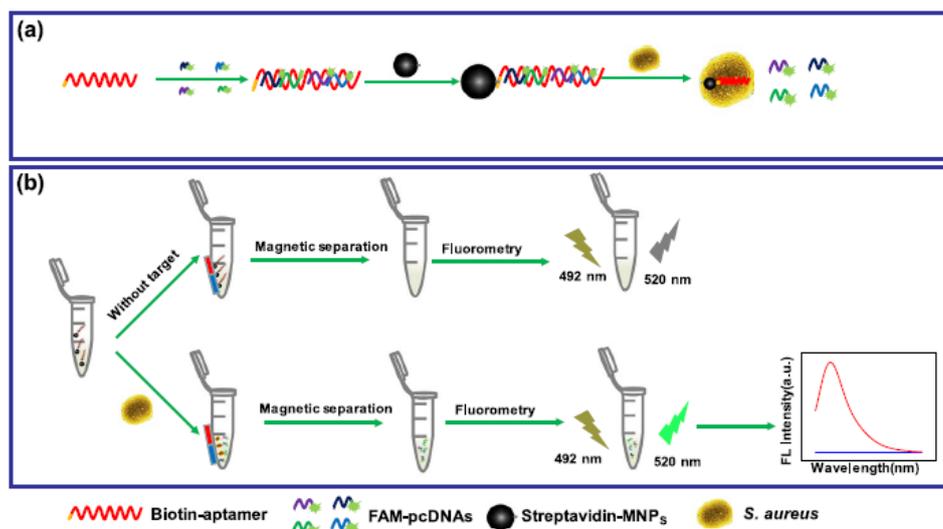


Figure 20 Représentation schématique de l'aptasensor fluorimétrique pour la détection de *S. aureus* (Chen et al., 2022).

Les aptamères spécifiques ont été biotinylés et hybridés avec des séquences complémentaires marquées par un fluorochrome FAM (Fluorescein Amidite) (**Figure 20**). L'ensemble a été couplé à des nanoparticules magnétiques, par une liaison biotine-streptavidine. En présence des bactéries, l'aptamère se lie à *S. aureus* et les sondes FAM sont libérées dans le surnageant. La concentration de *S. aureus* est alors quantifiée par la fluorescence des sondes FAM libérées. Ce test fluorimétrique rapide a montré une spécificité et une sensibilité élevées pour la détection de *S. aureus* dans des échantillons de sang (Chen et al., 2022).

Les toxines sont également recherchées pour le diagnostic de certaines infections bactériennes. Par exemple, la toxine A est l'une des entérotoxines produites par *Clostridioides difficile*. Les tests de laboratoire actuels consistent à détecter par PCR les toxines dans les échantillons de selles, cependant ce dosage cytotoxique est coûteux et nécessite que le personnel soit formé (Chandola et al., 2016). Luo *et al.* ont développé un aptasensor électrochimique fondé sur un changement conformationnel pour détecter quantitativement la toxine A (Luo et al., 2014). L'aptamère a été couplé à un oligonucléotide complémentaire. L'ensemble a été immobilisé à la surface de l'électrode. En présence de la toxine A, l'aptamère se dissocie de la surface de l'électrode pour former le complexe aptamère-toxine A. Une réduction du signal est observée, en corrélation avec la concentration de toxines. Les résultats de cette étude ont montré une bonne spécificité de cet aptasensor et une bonne reproductibilité du test (Luo et al., 2014).

IV.A.2.ii. Virus

Les aptamères peuvent détecter les infections virales. Park *et al.* ont développé un test ELISA (*Aptamer-based ELISA*) pour quantifier les particules infectieuses virales, en utilisant des aptamères spécifiques de la protéine d'enveloppe du VHC, le virus de l'hépatite C (Park et al., 2013). Deux aptamères ont été utilisés en configuration sandwich, grâce à leurs sites de liaison différents. Un aptamère de capture a donc été immobilisé à la surface des puits de la plaque de titration et a capturé les protéines de surface tandis que l'autre aptamère biotinylé a permis la détection. En présence des particules virales, l'aptamère biotinylé de détection a interagit avec la streptavidine conjuguée à la HRP (*horseradish peroxidase*) et ce, proportionnellement aux quantités de virus. Ce dosage du virus de l'hépatite C pourrait également être utilisé pour évaluer l'efficacité de certains antiviraux.

Les cellules infectées peuvent être également détectées spécifiquement par les aptamères. Ainsi, Parekh *et al.* ont sélectionné des aptamères spécifiques de l'hémagglutinine A du virus

de la vaccine (VARV), présente à la surface des cellules infectées. Ces aptamères peuvent être utilisés à des fins diagnostiques (Parekh et al., 2010).

IV.A.2.iii. Parasites

Des aptamères ont été sélectionnés avec succès contre un certain nombre de parasites, et certains ont été développés comme aptasensors pour la détection de *Plasmodium* spp, *Trypanosoma* spp, *Leishmania* spp, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii* ou *Trichomonas vaginalis* (Chen et al., 2022).

Martin *et al.* ont sélectionné des aptamères capables de reconnaître une protéine, l'histone LiH2A de *Leishmania infantum* (Martín et al., 2013). Ces aptamères ont permis de détecter le parasite par un test ELONA (*Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay*) ainsi que de purifier la protéine au sein d'un mélange protéique. Pour cela, un lysat protéique est préparé à partir du parasite et est immobilisé sur des plaques. L'aptamère spécifique et biotinylé est ensuite incubé avec le lysat protéique. L'ajout de streptavidine couplée à la HRP permet la détection de la protéine.

IV.A.2.iv. Tumeurs

Un diagnostic rapide et fiable est crucial pour une détection précoce et pour l'amélioration du pronostic de tumeurs. Des aptamères ont été développés pour la détection d'un certain nombre de biomarqueurs liés à des tumeurs et pour la détection des cellules cancéreuses.

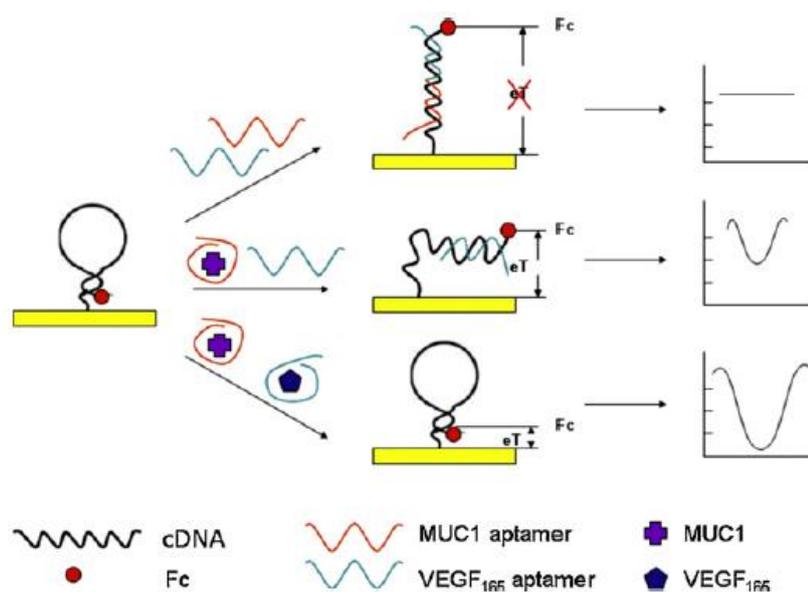


Figure 21 Représentation schématique de l'aptasenseur électrochimique développé pour la détection de deux biomarqueurs du cancer du sein (Zhao et al., 2012).

Par exemple, la mucine-1 humaine (MUC-1) et le facteur de croissance endothélial vasculaire 165 (VEGF-165) sont des biomarqueurs importants pour le diagnostic du cancer du sein (Zhao et al., 2012). Un aptasensor électrochimique « signal on » a été développé pour la détection de ces deux biomarqueurs (Zhao et al., 2012). Un oligonucléotide complémentaire marqué au ferrocène est immobilisé sur une électrode (**Figure 21**). En l'absence de biomarqueurs, les aptamères contre MUC-1 et VEGF-165 se couplent à l'oligonucléotide complémentaire pour former un double brin, ce qui n'entraîne aucun signal car le ferrocène se trouve loin de la surface de l'électrode. En présence d'un seul des biomarqueurs, le détachement des aptamères va réduire la distance entraînant un signal mesurable. Dans le cas où les deux biomarqueurs sont présents, ce signal est augmenté. Le recours à ce type d'aptasensor peut être étendu à d'autres types de tumeurs (Zhao et al., 2012). Les aptamères ont également été utilisés avec succès pour la détection d'un certain nombre de biomarqueurs solubles liés à des tumeurs, notamment l'antigène carcinoembryonnaire ou encore l'antigène spécifique de la prostate (APS) (Chandola et al., 2016) .

IV.B. Les aptamères, des outils thérapeutiques

Les aptamères sont utilisés en thérapeutique, selon deux principales stratégies :

- En tant que molécule thérapeutique
- En tant que vecteur de délivrance de médicaments

IV.B.1. Les aptamères, des molécules thérapeutiques

Les aptamères utilisés comme molécules thérapeutiques fonctionnent de deux manières. Les aptamères peuvent être des antagonistes de leurs cibles ou au contraire des agonistes, en favorisant la fonction de la protéine cible. Le pegaptanib (Macugen ®) est le seul aptamère antagoniste qui a été commercialisé et approuvé pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Le pegaptanib bloque le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), qui joue un rôle clé dans la pathogénèse de la maladie (Ku et al., 2015). Les études cliniques ont montré son efficacité : après six semaines de traitement, l'acuité visuelle moyenne des patients recevant une dose de 0,3 mg de pegaptanib était améliorée par rapport aux patients ayant reçu le placebo (Gragoudas et al., 2004; Rosina et al., 2008).

Un certain nombre d'aptamères sont entrés dans des phases cliniques, notamment pour le traitement de maladies oculaires, hématologiques ou encore de tumeurs (Kumar Kulabhusan et al., 2020; Nimjee and Sullenger, 2020; Li et al., 2021). AS1411, est un aptamère à ADN ciblant la nucléoline avec une affinité et une spécificité élevées, qui provoque un puissant effet

antiprolifératif sur une variété de cellules (Tong et al., 2022). La nucléoline est une protéine jouant un rôle dans la croissance, la survie et la prolifération cellulaire. Cette protéine se localise principalement dans le noyau des cellules saines, tandis que dans le cas des cellules tumorales, elle est surexprimée dans le cytoplasme et à la surface cellulaire. AS1411 cible préférentiellement le domaine externe de la nucléoline de surface des cellules cancéreuses (Tong et al., 2022). Cet aptamère a atteint la phase IIb des essais cliniques pour le traitement de la leucémie myéloïde aigue et du carcinome à cellules rénales. Cependant, malgré une bonne tolérance, l'essai a été interrompu en raison d'une clairance trop rapide de cet aptamère (Tong et al., 2022).

Des aptamères antiviraux ont également été développés, principalement contre le VIH (Bala et al., 2018). La glycoprotéine gp120 joue un rôle critique dans la reconnaissance virus/cellules, en interagissant avec le récepteur CD4 des lymphocytes T. Des aptamères sélectionnés contre cette protéine ont montré une action de neutralisation de l'infection du VIH, en bloquant l'entrée du virus dans les cellules hôtes (Bala et al., 2018).

Pour les bactéries, très peu d'aptamères ont été décrits comme agents antibactériens (Lee et al., 2015). Par exemple, un aptamère à ARN a été sélectionné contre une protéine structurale du sérovar *Salmonella* Typhi (responsable de la fièvre typhoïde). L'aptamère développé était capable d'inhiber l'invasion des lignées cellulaires de monocytes humains par les bactéries et d'agir comme agent antibactérien (Davydova et al., 2015).

Des aptamères ont également été développés en tant que nouveaux médicaments vis-à-vis d'infections parasitaires. Ulrich *et al.* ont sélectionné des aptamères à ARN contre des récepteurs (fibronectine, thrombospondine, héparane sulfate ou laminine) présents à la surface cellulaire et impliqués dans l'invasion du parasite *Trypanosoma cruzi*. Le pool d'ARN sélectionné a été capable d'inhiber l'invasion du parasite *in vitro*, en se fixant aux trois récepteurs de surface (Ulrich et al., 2002).

IV.B.2. Les aptamères, des systèmes de délivrance des médicaments

L'administration de médicaments spécifiques à des cellules cibles peut aider à augmenter l'efficacité d'un médicament et à en réduire les effets secondaires. En plus de leur potentiel en tant qu'agents thérapeutiques, les aptamères ont également été explorés comme systèmes de délivrance de médicaments ou de petits oligonucléotides tels que les petits ARN interférents (siARN) et les microARN (miARN). La capacité des aptamères à reconnaître spécifiquement une cible et à être facilement modifiés en fait un outil potentiel de délivrance ciblée. Les aptamères sont utilisés de deux manières, soit en étant directement liés aux

molécules de médicament, soit en étant conjugués à des nanomatériaux, comme les nanoparticules, les liposomes, les micelles... (Chandola et al., 2016).

Ces systèmes de délivrance ont été principalement testés en chimiothérapie, en radiothérapie et en thérapie génique. Ils ont pour avantage de cibler des tissus tumoraux spécifiques, évitant que les principes actifs n'exercent leur toxicité vis-à-vis de cellules saines. Par exemple, l'aptamère AS1411 conjugué à des liposomes a permis de délivrer spécifiquement la doxorubicine dans les cellules tumorales cibles, et d'augmenter son accumulation dans les tissus tumoraux tout en préservant les tissus sains, ce qui a permis de réduire sa cardiotoxicité *in vivo* (Chandola et al., 2016). Un autre exemple est la stratégie développée par Dhar *et al.* pour délivrer le cisplatine, un anticancéreux, aux cellules cancéreuses de la prostate (Dhar et al., 2008). Le cisplatine a été encapsulé dans des nanoparticules de PEG conjuguées avec les aptamères. Ce système a permis de délivrer une dose létale de cisplatine spécifiquement aux cellules cancéreuses de la prostate (Dhar et al., 2008).

IV.C. Les aptamères en imagerie *in vivo*

Le poids moléculaire des aptamères est un avantage considérable pour une pénétration tissulaire et une élimination rapide. Ces deux paramètres sont particulièrement recherchés pour l'imagerie (Bouvier-Müller and Ducongé, 2018). Plusieurs aptamères ont été testés dans différentes méthodes d'imagerie, comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'imagerie par fluorescence...

Le premier aptamère utilisé en imagerie a été obtenu en 1997 par Charlton *et al.* Leur étude a utilisé un aptamère spécifique de l'élastase des neutrophiles qui est une sérine protéase sécrétée lors de l'inflammation (Charlton et al., 1997). Cet aptamère radiomarqué au technétium 99 (99m Tc) a été injecté par voie intraveineuse à des rats présentant une inflammation des membres antérieurs. Un signal plus intense a été observé avec l'aptamère, comparé à un contrôle positif utilisant un anticorps. L'aptamère a également montré une clairance plus rapide, ce qui est un avantage recherché en imagerie (Charlton et al., 1997).

Par la suite, de nombreux aptamères ont été utilisés avec succès pour l'imagerie de cellules tumorales. Par exemple, Kuo *et al.* ont démontré que l'aptamère AS1411 conjugué à des nanoparticules fluorescentes pouvait être utilisé comme marqueur visuel des cellules cancéreuses du poumon et comme produit de contraste en IRM (Kuo et al., 2014). Les aptamères utilisés en imagerie peuvent donc participer à l'amélioration du diagnostic et à l'imagerie chirurgicale.

V. Leurs applications actuelles et potentielles aux maladies transmissibles par les tiques

Les applications actuelles et potentielles des aptamères aux maladies vectorisées par les tiques ont fait l'objet d'une revue soumise dans le journal *Veterinary Parasitology*.

Revue : Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Boulouis, H.-J.; Lagrée, A.-C.; Deshuillers, P.L; Haddad, N. **Tick-borne diseases in Europe : current control and prevention tools and the promise of aptamers.**

Tick-borne diseases in Europe: current prevention and control tools and the promise of aptamers

Lisa Lucie Le Dortz¹, Clotilde Rouxel¹, Henri-Jean Boulouis¹, Anne-Claire Lagrée¹, Pierre Lucien Deshuillers¹, Nadia Haddad¹

¹ ANSES, INRAe, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, Laboratory of Animal Health, Maisons-Alfort, F-94700, France

* Correspondence:

Nadia Haddad

nadia.haddad@vet-alfort.fr

Abstract

In Europe, tick-borne diseases (TBDs) cause significant morbidity and mortality, affecting both human and animal health. Ticks can transmit a wide variety of pathogens (bacteria, viruses, and parasites) and feed on many vertebrate hosts. The incidence and public health burden of TBDs are tending to intensify in Europe due to various factors, mainly anthropogenic and often combined. Early detection of tick-borne pathogens (TBPs), preventive measures and treatment are of great importance to control TBDs and their expansion. However, there are various limitations in terms of the sensitivity and/or specificity of detection and prevention methods, and even in terms of feasibility. Aptamers are single-stranded DNA or RNA that could address these issues as they are able to bind with high affinity and specificity to a wide range of targets (e.g., proteins, small compounds, and cells) due to their unique three-dimensional structure. To date, aptamers have been selected against TBPs such as tick-borne encephalitis virus, *Francisella tularensis*, and *Rickettsia typhi*. These studies have demonstrated the benefits of aptamer-based assays for pathogen detection and medical diagnosis. In this review, we address the applications of aptamers to TBDs and discuss their potential for improving prevention measures (use of chemical acaricides, vaccination), diagnosis and therapeutic strategies to control TBDs.

Keywords: Tick-borne disease, aptamer, detection, therapeutic, prevention.

30 **1. Introduction**

31 **1.1 Ticks and Tick-Borne Pathogens in Europe**

32 In Europe, ticks are the most important vectors of animal and human pathogens, as they transmit
33 a wider variety of infectious agents (bacteria, parasites, and viruses) than other vectors (Bonnet
34 et al., 2017a). There are around 70 species of ticks in Europe, classified into two families:
35 Argasidae, also known as soft ticks, and Ixodidae, or hard ticks (Černý et al., 2020). Hard ticks
36 are responsible for the transmission and circulation of a wide range of pathogens. In Europe,
37 the most important tick-borne pathogens (TBPs) are tick-borne encephalitis virus (TBEV),
38 *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex spirochetes and *Anaplasma phagocytophilum*, all
39 transmitted by *Ixodes ricinus*, the main vector of zoonotic TBPs in central and northern Europe
40 (Table 1). TBPs are usually transmitted through tick bites, but can occasionally be spread via
41 other routes, like ingesting contaminated food products (TBEV) or via aerosols (*Coxiella*
42 *burnetii* and *Francisella tularensis*) (Table 1). For zoonotic TBDs, humans are accidental hosts
43 and for the most part, dead-end hosts. Both humans and animals can be clinically affected
44 (Table 1). Ticks acquire pathogens during a blood meal on an infected vertebrate. After feeding,
45 pathogens migrate from the tick gut to the salivary glands and are then transmitted to the next
46 vertebrate host that the tick feeds on. Ticks can maintain these pathogens in their body for a
47 long time and can transmit them by transstadial transmission (from stage to stage), by horizontal
48 transmission (blood meal on an infected host and/or cofeeding) or, less frequently, by
49 transgenerational transmission (transovarial transmission from adults to eggs).

50 Ticks can feed on a wide range of potential hosts (Bonnet et al., 2017a). Wild animals serve as
51 a food resource and as dispersal hosts for ticks, as they are often exposed to different ticks and
52 their associated pathogens. They can act as a reservoir for various TBPs, allowing these
53 pathogens to survive within the ecosystem. The reservoirs are still unknown for some pathogens
54 (Table 1). Domestic animals can be spillover hosts, sentinel hosts in a given area, or act as
55 feeders and/or even reservoirs.

56 **1.2 Incidence and impact of Tick-Borne Diseases in Europe**

57 The incidence of tick-borne diseases (TBDs) in Europe is increasing, giving rise to growing
58 public health concerns in particular for Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis (TBE).
59 Approximately 128,000 cases of Lyme borreliosis are reported annually in Europe (Burn et al.,

60 2023) and more than 12,500 TBE human cases are reported annually from 23 risk countries
61 (Ott et al., 2020). Some TBPs are also highly pathogenic for livestock, resulting in significant
62 economic losses. *Coxiella burnetii* and *Anaplasma phagocytophilum*, for example, are
63 responsible for abortions in cattle, and the economic losses due to abortions are estimated at
64 between 500 and 900 euros per animal (Sarangi et al., 2021).

65 The increasing incidence of TBDs is strongly linked to changes in human activities (Diuk-
66 Wasser et al., 2021). Climate change is leading to warmer winters, longer summers and higher
67 temperatures, resulting in longer periods of tick activity. The territory of *Ixodes ricinus* is set to
68 expand in Europe, with an extension into higher altitudes and latitudes (Estrada-Peña et al.,
69 2012; Porretta et al., 2013; Semenza and Suk, 2018). Recent agricultural changes in Europe,
70 such as the intensification of livestock production and outdoor grazing, lead to more interactions
71 between ticks, livestock, and humans, thus increasing the risk of TBP transmission (Mysterud
72 et al., 2017). All these factors are tending to intensify the risk of TBDs in northern and central
73 Europe. The control of TBDs is therefore one of the major challenges of the 21st century.

74 **1.3 Current Challenges in Tick-Borne Disease Control**

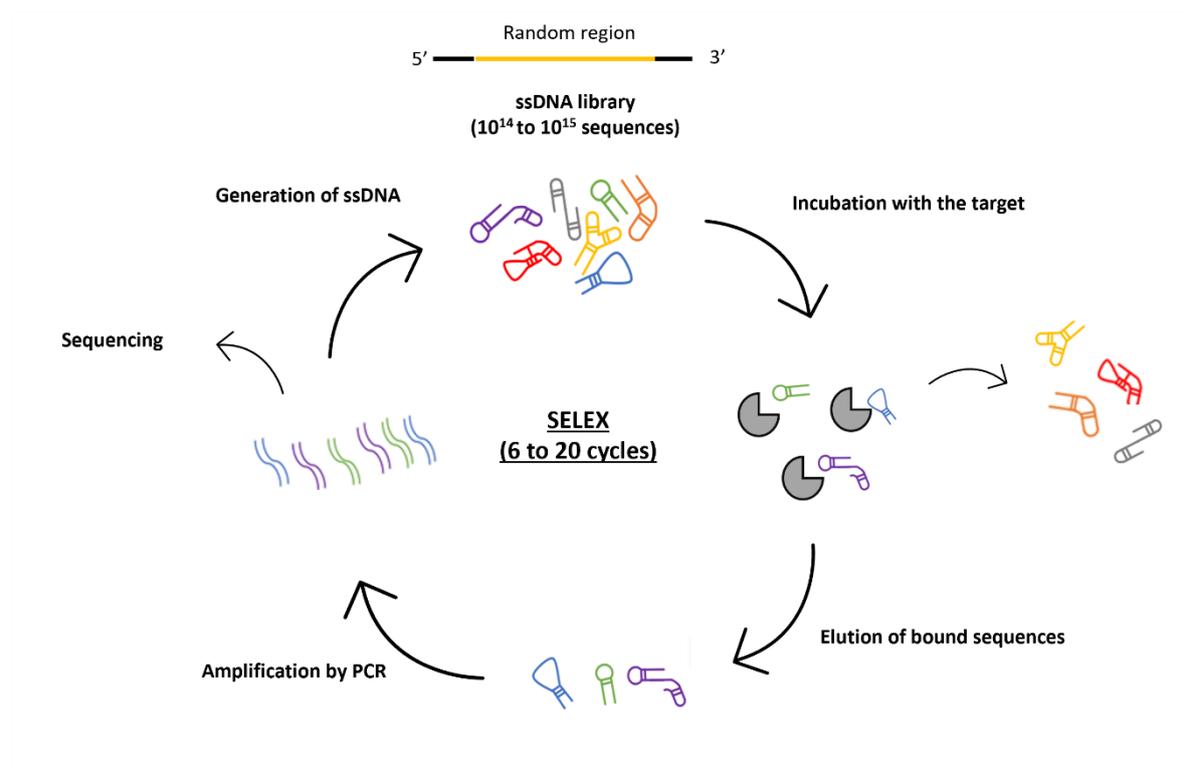
75 TBDs are currently controlled through strategies that target the pathogen reservoir host and/or
76 the vector and/or the pathogen, and their interactions within the local environment. Vegetation
77 management has been part of tick control for centuries, the objective of hardscaping, for
78 example, being to create a tick-hostile environment. The establishment of boundaries between
79 naturally tick-infested forest habitats and cattle or human settlements can help reduce TBP
80 transmission. A decrease in deer numbers has been associated with a decrease in *I. ricinus*
81 populations in Europe (Černý et al., 2020). Landscape and host management are therefore
82 measures that can limit tick survival and reproduction. However, these measures can be
83 challenged from an ethical standpoint because their implementation could negatively impact
84 animal species and the environment, threatening biodiversity and ecosystems.

85 Preventing the introduction of non-autochthonous tick species and pathogens into new
86 territories, early detection of TBPs, prevention through vaccination, and treatment of TBDs are
87 all of paramount importance. Aptamers may provide alternatives to conventional methods for
88 TBP and TBD control. The aim of this review is to show how aptamers can be used as new
89 potential tools to control TBDs. First, aptamer technology will be presented as an introduction
90 to these innovative ligands. Next, aptamers currently developed against TBPs and their
91 potential applications in preventive measures (use of chemical acaricides, vaccination),

92 diagnosis, and therapeutic strategies will be presented and discussed while putting them into
93 perspective in relation to other approaches that are currently available.

94 **2. Aptamer-based technologies**

95 In 1990, two breakthrough studies led to the discovery of aptamers and their selection methods
96 (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990). Aptamers are defined as single-stranded
97 DNA or RNA, or chemically modified nucleotides. They fold into a unique three-dimensional
98 structure resulting from a combination of hydrogen bonding and electrostatic or Van der Waals
99 interactions (Famulok et al., 2014). This folding allows aptamers to bind with high affinity and
100 specificity to a wide variety of targets, such as proteins, lipids, carbohydrates, and ions.
101 Aptamers are often qualified as “chemical antibodies”, with potential advantages in terms of
102 synthesis, stability and non-toxicity, making them suitable for clinical and industrial
103 applications (Zhou et al., 2017). Since their discovery, aptamers have been mainly developed
104 for research, diagnostic, therapeutic, and bioimaging purposes.



105

106 **Figure 1** Schematic illustration of the main steps of the SELEX method.

107 Aptamers are produced using an *in vitro* selection method called SELEX (for Systematic
108 Evolution of Ligands by EXponential enrichment, **Figure 1**). This method entails several
109 rounds of selection and amplification (Wu et al., 2014). Selection begins with a random ssDNA

110 or RNA library, composed of 10^{14} to 10^{15} different sequences. Each sequence has constant
111 regions at the 5'-end and 3'-end for PCR amplification, and a random region in the middle. The
112 first step entails incubating the library with the target, which can be any molecule or
113 combination of molecules (e.g., cell, virus, bacteria, or protein). After incubation, the unbound
114 aptamers are removed by washing, while the bound aptamers are eluted. Bound sequences are
115 then amplified by PCR, or RT-PCR for RNA aptamers. In the latter case, the resulting dsDNA
116 products are converted to RNA by an *in vitro* transcription step. In the case of DNA SELEX,
117 dsDNA products are converted to ssDNA. The final pool of ssDNA or RNA is then used for a
118 new round of selection. In general, the SELEX method comprises 6 to 20 selection cycles. As
119 selection proceeds, the library is progressively enriched with sequences that have a high affinity
120 for the target (Bouvier-Müller et al., 2018). This selection method saves time and money,
121 compared with antibody production. It also cuts down on time, as the SELEX method takes
122 anything from a few weeks to a few months, compared with at least six months for antibody
123 development. Due to the use of laboratory animals, antibody production is also subject to ethical
124 and technical constraints (Keefe et al., 2010). Once selected, aptamer sequences can be
125 chemically synthesized directly with a high degree of reproducibility, facilitating large-scale
126 implementation.

127 Aptamers are more stable than antibodies. Their thermal denaturation is reversible, and they
128 can recover their conformation after a change in temperature. These significant advantages
129 facilitate their repeated use and storage (Thiviyanathan et al., 2012). Unlike antibodies,
130 aptamers are not considered to be immunogenic. So far, no study has ever demonstrated
131 activation of the immune system following their use *in vivo* (Kovacevic et al., 2018).

132 Finally, antibodies and aptamers can bind to a target with high affinity. Antibody targets are
133 necessarily immunogenic while aptamer targets are more diverse, ranging from small molecules
134 such as ions or peptides to complex molecules like proteins, carbohydrates or lipids.

135 Despite these many advantages, antibodies still dominate the therapeutic and diagnostic fields.
136 One explanation for this is that aptamers have only been developed quite recently. SELEX
137 requires staff training and is associated with a high failure rate, estimated at over 70% (Famulok
138 and Mayer, 2014). Although highly specific, aptamers could also interact with an incorrect
139 target *in vivo*. A negative selection step can be applied during the SELEX to improve their
140 specificity. In addition, the limited bioavailability of aptamers is one of the main obstacles to
141 their development, especially in therapeutics (Keefe et al., 2010). The average time for

142 degradation of oligonucleotides in the blood varies from a few minutes to several tens of
143 minutes, depending on the concentration and three-dimensional structure of the oligonucleotide
144 (Keefe et al., 2010). Their half-life in the blood is therefore very short. Due to their small size
145 (6 and 30 kDa), aptamers are able to cross biological barriers and distribute rapidly and widely
146 in plasma and tissues. However, they are easily filtered by the renal glomerulus, which removes
147 substances with a molecular weight below 30-50 kDa from the bloodstream. To improve their
148 bioavailability *in vivo*, chemical modifications of aptamers are possible, such as the
149 incorporation of polyethylene glycol (PEG) ligands or modification of 3' or 5' termini (Chan et
150 al., 2022). This innovative technology has already demonstrated its efficiency but is complex
151 and requires high level of expertise in this field (Chan et al., 2022).

152 **3. Aptamers for the detection of TBPs and the diagnosis of TBDs**

153 Early and sensitive detection of TBPs is paramount for both surveillance and diagnosis. TBPs
154 can be detected by analyzing collected ticks, domestic or wild sentinel animals, contaminated
155 products (e.g., dairy products) and/or environments. There are two different types of detection
156 methods. Direct methods detect TBP circulation in real time, whereas indirect methods detect
157 the immune response induced by the pathogen in a human or animal that is currently infected
158 or has been previously infected.

159 **3.1 Current Detection Methods**

160 **3.1.1 Direct methods**

161 (RT)-PCR is a direct method commonly used in laboratories to detect nucleic acids from a wide
162 range of samples, such as blood, organs, ticks, or a contaminated environment. This method is
163 monospecific, as it can only detect one pathogen at a time. Real-time PCR has replaced classical
164 PCR, as it offers both greater sensitivity and multiplexing to detect several pathogens in a single
165 run. A novel high-throughput epidemiological surveillance method has been developed to
166 simultaneously identify major and neglected European TBPs. This microfluidic system, based
167 on different real-time PCRs performed in parallel, was initially developed to detect 25 bacteria
168 and 12 parasites from 45 to 96 samples, depending on the chip (Michelet et al., 2014). This
169 system was also adapted to confirm the species of ticks collected in the field and extended to
170 other TBPs and to mosquito-borne viruses (Gondard et al., 2018; Moutailler et al., 2019). This
171 tool is a real asset for TBD surveillance as it offers large-scale screening by testing many
172 samples, but it requires subsequent confirmation of positive results and specific laboratory

173 equipment. In addition, the detection of TBPs by PCR has certain limitations, as a PCR can be
174 inhibited in biological samples and a negative result does not rule out infection; this is
175 particularly true for arboviruses, which cause only brief viremia for a few days. PCR is also not
176 recommended for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) in human samples, which
177 is rarely detectable in the blood or only at very low concentrations (Aguero-Rosenfeld et al.,
178 2005).

179 The next-generation sequencing (NGS) technologies has revolutionized traditional sequencing
180 by generating thousands to hundreds of millions of reads present in a sample and by giving
181 more information on the distribution of TBPs in new geographical areas and on new emerging
182 pathogens for research and diagnostic purposes (Tokarz and Lipkin, 2020). The amplicon-based
183 approach coupled to shotgun metagenomic sequencing has recently enabled the sequencing of
184 almost 90% of TBEV genomes directly from patient blood samples, with a viral load as low as
185 3.8×10^4 copies per mL) (Zakotnik et al., 2022). The combination of these two approaches
186 therefore seems promising for the direct detection of the genome of vector-borne pathogens
187 from clinical samples. Another limit of whole sequencing relates to the presence in the samples
188 of high percentage of host cell DNA for strict intracellular pathogens. Nanopore adaptive
189 sampling is a promising new sequencing method making it possible to enrich sequences of
190 interest and to delete sequences coming from the host but is still underdeveloped (Kipp et al.,
191 2021). In conclusion, NGS sequencing is a very promising tool for the detection of pathogens
192 in samples, but is not yet standardized and routinely used.

193 Other direct methods are based on the detection of TBPs by microscopic visualization of
194 bacteria and parasites and/or by isolation and subsequent culture. The detection by microscopy
195 is time-consuming and lacks sensitivity, especially for *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia*
196 *canis* species, which are found in only 3% of infected monocytes (Ismail et al., 2010). Thus, a
197 negative result does not exclude an infection, and this method must be combined with another
198 technique such as molecular detection by PCR. Another direct detection method consists of
199 isolating and amplifying bacteria or viruses from a sample in cell culture, mouse brain, or
200 chicken embryo (Migné et al., 2021). However, isolation is very rarely practiced in laboratory
201 diagnostics, as it requires trained staff and days of culture with a specific environment and
202 growth conditions. The isolation of TBPs is therefore not a first-line method for the detection
203 and diagnosis of TBDs.

204 Another direct method consists in detecting antigens of bacteria, viruses or protozoa in
205 biological samples or cultures obtained after primary isolation using immunological methods
206 such as immunofluorescence. This requires specific hyperimmune sera or monoclonal
207 antibodies, but the paucity of antigen kits on the market limits their use (Arstila et al., 1988).

208 **3.1.2 Indirect methods**

209 Indirect methods for TBPs are based on the detection of specific antibodies. IgMs are produced
210 after the first week of infection, followed by IgGs, which persist in the organism for a period
211 ranging from months to years (Alcon-Chino et al., 2022). Serodiagnosis therefore has a wider
212 window of detection than direct detection. Tests include the enzyme-linked immunosorbent
213 assay (ELISA), complement fixation reaction, serum neutralization, hemagglutination tests,
214 immunoblotting and immunofluorescence (Alcon-Chino et al., 2022).

215 The immunofluorescence assay (IFA) is considered the gold standard for confirming *Babesia*,
216 *C. burnetii*, *Ehrlichia*, *Rickettsia* or *Anaplasma* infection (Tokarz et al., 2018). The sensitivity
217 of IFAs can vary widely between laboratories, mainly due to the lack of standardized antigenic
218 targets, cross-reactivity, and subjective setting of positivity thresholds (Tokarz et al., 2018).

219 The reference serological method for the detection of arboviruses is the plaque neutralization
220 assay; which detects and quantifies neutralizing antibodies in the serum by observing the
221 cytopathic effects of the virus on a cell monolayer (Varghese et al., 2023). This technique can
222 be used with sera from a variety of animal species. However, it requires at least biosafety level
223 3 infrastructure, trained staff and is time-consuming.

224 ELISAs are mainly used to detect tick-borne protozoan and bacterial infections (Bakheit et al.,
225 2007). To detect the agent responsible for Lyme borreliosis, the recommended combination is
226 an ELISA followed by confirmation by Western blot, which detects many immunoreactive
227 proteins (Gočko et al., 2019). However, this method is labor intensive and uses subjective
228 criteria for interpreting the results, which may affect reproducibility.

229 Serological assays have been developed to simultaneously detect multiple TBPs in order to
230 improve diagnosis and monitoring of these infections. For example, the SNAP® 4Dx® Plus
231 test (IDEXX) offers the simultaneous detection of five tick-borne bacterial infections from dog
232 blood, plasma or serum (*A. phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *E. canis*, *Ehrlichia ewingii*,
233 and *B. burgdorferi sensu lato*) (Beall et al., 2022). Recently, a TBP serochip has been developed
234 using an extensive array of linear peptides capable of identifying immunodominant epitopes.

235 This method was developed to discriminate between antibodies of eight major TBPs in the
236 United States, including *A. phagocytophilum*, *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi sensu*
237 *stricto*, *Borrelia miyamotoi*, *E. chaffeensis*, and *Rickettsia rickettsii* (Tokarz et al., 2018).

238 Although rapid and well-designed, serological tests have limitations. First, since seroconversion
239 is needed, they cannot be used at the very first step of infections. Furthermore, IgM and IgG
240 testing is needed to distinguish a recent seroconversion from a persistent infection. Second,
241 serological methods may lack specificity and sensitivity, depending on the number and affinity
242 of antibodies to the selected antigen. Finally, these tests pose a risk of cross-reactivity between
243 species. For example, if a human patient has a positive *Borrelia* serology result, the risk of
244 cross-reactivity with *Treponema pallidum*, and other spirochete species, must be considered
245 and confirmed by a *T. pallidum* hemagglutination assay (Luo et al., 2021). Low seropositivity
246 and false negatives in sera collected from immunocompromised patients may also bias results.

247 The use of conventional tools is limited by the wide variability and diversity of TBPs. This is a
248 real challenge for clinicians suspecting a TBD, and for microbiologists seeking to detect TBPs
249 for clinical and epidemiological research. New technologies and novel approaches need to be
250 developed to advance both surveillance and diagnosis.

251 **3.2 Aptamers to Diagnose TBDS**

252 Aptamers selected against TBPs have been mainly developed as detection tools (**Table 2**).
253 Several studies presented in this section have demonstrated the superiority of aptamer-based
254 assays over current diagnostic tools.

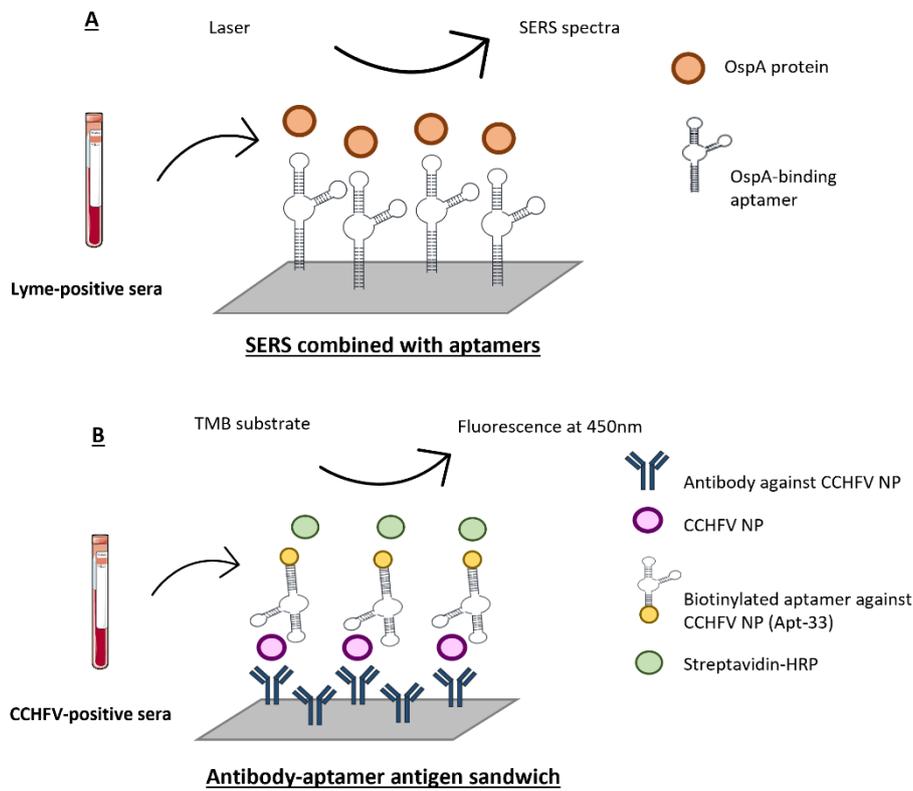


Figure 2 (A) Schematic illustration of surface-enhanced Raman spectroscopy combined with aptamers to detect the OspA protein of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (B) Schematic illustration of an antibody-aptamer antigen sandwich to detect Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sera.

256 Aptamers can detect the pathogen by capturing a specific antigen from blood samples. For
 257 example, Tabb et al. (2022) combined aptamers with surface-enhanced Raman spectroscopy
 258 (SERS) in order to detect the OspA protein (**Figure 2A**). OspA is a major antigen of the outer
 259 membrane of *B. burgdorferi sensu stricto*, expressed in the midgut of ticks and in later stages
 260 of mammalian host infection (Krupka et al., 2008). SERS detects a single molecule directly in
 261 biological fluid. This analytical tool must be very sensitive so it can detect low levels of the
 262 protein in serum. It must also be specific because of the possible spectral contributions of other
 263 serum proteins. Using an aptamer specific to OspA improved both the specificity and sensitivity
 264 of this technique. The study showed that the binding process between aptamers and the target
 265 protein altered its conformational structures, resulting in spectral differences between positive
 266 or negative sera. The technique's sensitivity was estimated at 91% and specificity at 96% (Tabb
 267 et al., 2022). This approach was also able to detect OspA at a low concentration of 1×10^{-4} ng
 268 protein/mL of serum. As OspA is downregulated during host infection, this assay could be

269 optimized to target other *B. burgdorferi* sensu stricto proteins in the blood, such as OspC for an
270 early detection or VlsE, which is expressed at all stages of Lyme borreliosis (Kim et al., 2023).

271 Aptamers could replace antibodies in detection methods, thus improving sensitivity and
272 specificity while reducing production costs. This was demonstrated through two studies. First,
273 Jalali et al. (2021) improved the diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) by
274 selecting aptamers against the nucleocapsid protein (NP) of the causative virus. NP is the main
275 structural protein of the virus and is an abundant antigen that is conserved and detectable in
276 blood samples (Jalali et al., 2021). Aptamers were selected against the recombinant form of the
277 protein, immobilized on magnetic beads. An antibody-aptamer antigen sandwich assay was
278 developed to detect the NP protein in serum samples (**Figure 2B**). For this, the serum was
279 incubated with an antibody specific to NP. After incubation, the biotinylated Apta-33 was added
280 as a reporter. Binding was revealed using horseradish peroxidase-streptavidin (HRP). The
281 results obtained with this method were compared with those provided by an antigen capture
282 ELISA and RT-PCR methods. The antibody-aptamer antigen sandwich assay improved the
283 detection threshold as it detected 90 ng of NP in human serum, against a minimum of 170 ng
284 for the standard ELISA technique. This method also demonstrated good sensitivity (97.95%)
285 and specificity (100%). Apta-33 had no affinity with other arboviruses such as dengue and
286 chikungunya viruses. Through this study, Jalali et al. (2021) confirmed the efficacy and
287 superiority of aptamer-based assays over the diagnostic tests currently available.

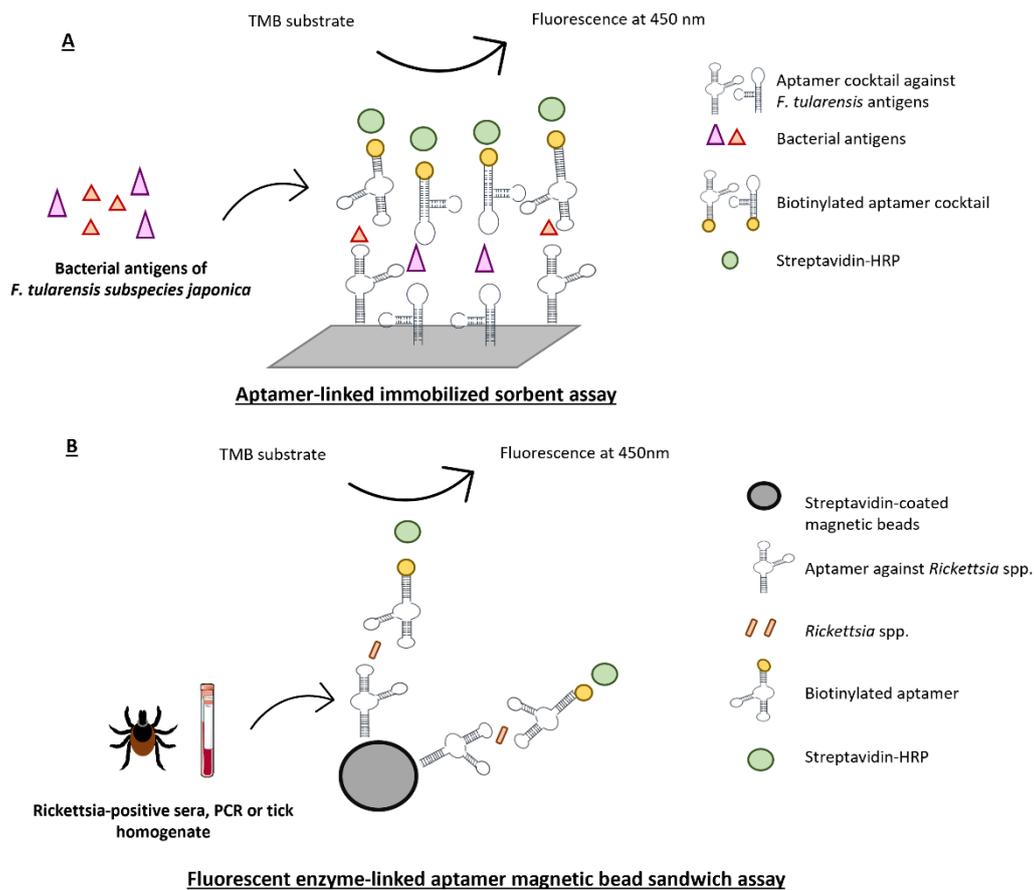


Figure 3 (A) Schematic illustration of an ALISA for *Francisella tularensis* detection. (B) Schematic illustration of the fluorescent enzyme-linked aptamer-magnetic bead sandwich assay for the detection of *Rickettsia* species.

288 Second, Vivekananda et al. (2006) developed aptamers against *F. tularensis* for detection
 289 purposes. Twenty-five aptamers were selected against a mixture of antigens from *F. tularensis*
 290 sbsp. *japonica* and then used for an aptamer-linked immobilized sorbent assay (Vivekananda
 291 et al., 2006) (ALISA, **Figure 3A**). The specificity of this method was determined by incubating
 292 an aptamer cocktail with *F. tularensis* sbsp. *holarctica* or *Bartonella henselae* antigens. The
 293 aptamer-based assay showed cross-reactivity for the two *F. tularensis* subspecies and very low
 294 affinity for *B. henselae*. In addition, this assay was compared with a classical ELISA using
 295 antibodies. The aptamer-based assay results showed better sensitivity, as the limit of detection
 296 of the aptamer cocktail was 25 ng of antigen while the limit of detection for antibodies was 100
 297 ng of antigen. In addition, the antibody test had a higher level of nonspecific binding affinity
 298 with albumin and lysozyme than the aptamer cocktail. These aptamers have not yet been tested
 299 on clinical samples from infected patients.

300 Aptamers could also discriminate between related species, improving the specificity of the
301 diagnosis. This potential was demonstrated through two studies. Current diagnostic methods
302 for the *Rickettsia* genus are limited and cross-reactivity has been observed in serodiagnosis,
303 particularly between *Rickettsia typhi* and *Rickettsia japonica* (Aita et al., 2023). There is
304 therefore a real need to develop a specific and sensitive assay for detecting and discriminating
305 between *Rickettsia* species. To this end, Bruno et al. (2016) developed an enzyme-linked
306 aptamer-magnetic bead sandwich for the detection of *R. typhi*. In this study, aptamers were
307 selected against *R. typhi*, purified on a density gradient from murine host cells (Bruno et al.,
308 2016). There was a negative selection with spotted fever group species such as *Rickettsia bellii*,
309 *Rickettsia conorii*, *Rickettsia parkeri*, and *R. rickettsii*. Three aptamers showed a high affinity
310 against *R. typhi*. Several combinations of these aptamers were tested to develop a fluorescent
311 enzyme-linked aptamer-magnetic bead sandwich assay designed to detect *R. typhi* (**Figure 3B**).
312 The use of the 18-R aptamer (capture and reporter aptamer) alone improved detection of
313 bacterial cells, with a limit of detection ranging from 100 to 1,000 cells/mL of *R. typhi* in a
314 variety of matrices: PBS, human serum, and tick homogenates. However, despite the negative
315 selections made, the prototype assay did not discriminate between *Rickettsia* species in the
316 typhus and spotted fever groups, and also recognized bacteria in the *Orientia* genus. This
317 prototype remained specific to the *Rickettsiaceae* family and did not detect unrelated bacterial
318 species such as *E. coli* and murine host cells. This study demonstrated the difficulty in
319 differentiating *Rickettsia* species, but suggested avenues for improvement, such as the use of
320 multivalent aptamers with multiple binding sites within their structures.

321 The differential diagnosis of flaviviruses is complicated due to their similar symptoms and
322 shared endemic areas. For example, TBEV is the most common tick-borne flavivirus and
323 dengue virus (DENV) is one of the most important mosquito-borne flaviviruses. At the early
324 stage of infection, clinical manifestations are non-specific, with flu-like symptoms (e.g.,
325 headache, fever, and muscular pain) for both, making differential diagnosis difficult. Liu et al.
326 (2023) developed an innovative sorting system for differential diagnosis of DENV and TBEV.
327 Specific aptamers were coupled with polystyrene microspheres of different diameters to
328 specifically capture viral particles of DENV or TBEV (Liu et al., 2023). The microspheres were
329 then sorted into different outlets using traveling surface acoustic waves (TSAWs). After sorting,
330 the captured viruses were characterized by RT-PCR, electron or confocal microscopy. This
331 innovative approach was effective for separating viral particles without damage prior to
332 subsequent analysis. The relative genetic expression obtained by RT-PCR was correlated with

333 the initial virus concentration. This method could therefore be combined with other diagnostic
334 tools (such as RT-PCR or Western blot) and could improve detection sensitivity. Further studies
335 are required to test capture from biological samples.

336 Finally, Bruno et al. (2012) published a full study listing the sequences of aptamers selected
337 against five arboviruses including chikungunya (CHIKV), DENV, CCHFV, TBEV and West
338 Nile virus (WNV) (Bruno et al., 2012). Aptamers were selected either against recombinantly-
339 produced viral envelope proteins/peptides or against inactivated viral particles. The affinity of
340 selected aptamers was determined in order to rank them. Aptamers selected against CCHFV
341 were tested by a preliminary fluorescent aptamer-magnetic bead sandwich assay. A biotinylated
342 aptamer was coupled with streptavidin-magnetic beads to capture viral particles. A reporter
343 aptamer conjugated with a fluorescent dye at 655 nm was then added and detection was assessed
344 using a spectrofluorometer and verified using a fluorescence microscope. This assay was able
345 to capture viral particles of CCHFV, but further studies are required to study specificity and
346 sensitivity. This work clearly demonstrated the potential of aptamers for diagnostic purposes
347 and provided a database of aptamer sequences that can be directly tested by the scientific
348 community.

349 **3.3. Aptamers for Tick-Borne Disease Surveillance**

350 One study showed that aptamers can also detect TBPs from contaminated environmental/food
351 matrices (Lamont et al., 2014), which could be helpful in monitoring TBDs and assessing their
352 distribution.

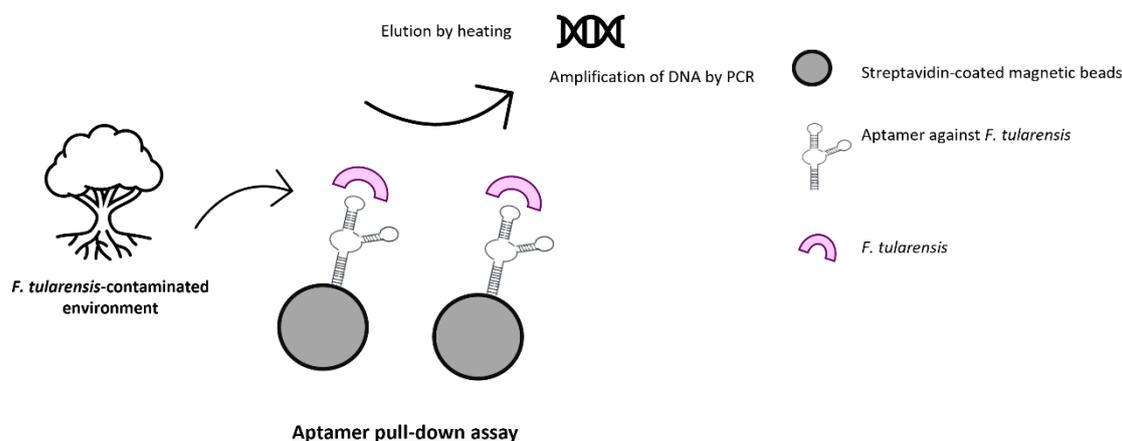


Figure 4 Aptamer pull-down assay for detecting *Francisella tularensis* in a contaminated environment.

353 Lamont et al. (2014) developed an aptamer pull-down assay for the enrichment of *F. tularensis*
354 in lettuce and soil (**Figure 4**). Aptamers were selected against these bacteria using negative
355 selection on soil bacteria. An aptamer cocktail consisting of ten specific aptamers was
356 conjugated with magnetic beads and incubated with lettuce or soil contaminated with *F.*
357 *tularensis* (Lamont et al., 2014). Samples were denatured and the supernatant containing
358 bacterial DNA was subjected to real-time PCR analysis. The DNA aptamer cocktail was able
359 to enrich *F. tularensis* from resident bacteria at a final concentration of 10^2 to 10^6 cells/mL.
360 This enrichment method could be used to detect *F. tularensis* in these matrices and prevent
361 transmission from contaminated environments.

362 For arthropod vectors, aptamers have the potential to detect specific TBP proteins present in
363 salivary glands. This application has already been developed for mosquito-borne pathogens
364 (Hall-Mendelin et al., 2010). Bosak et al. (2019) developed a tool to detect the E envelope
365 protein of Zika virus (ZIKV) and salivary proteins of mosquito vectors (*Aedes aegypti* and
366 *Aedes albopictus*) in the expectorated saliva and/or midgut of mosquitoes (Bosak et al., 2019).
367 After selection, aptamers with the most affinity were immobilized to form an aptamer-gold
368 nanoparticle conjugate (Apt-AuNPs) (**Figure 5**).

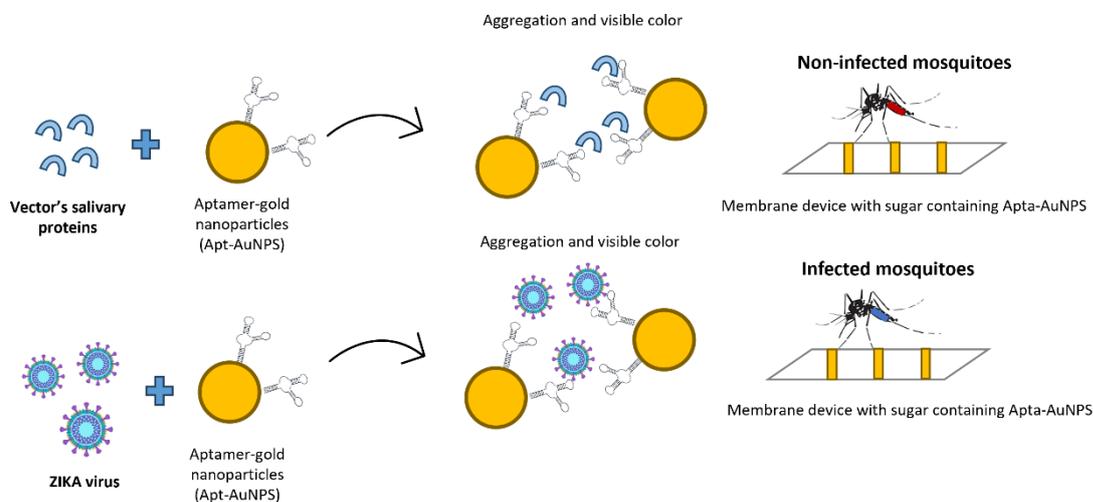


Figure 5 Colorimetric detection of Zika virus using aptamer-gold nanoparticles.

369 *In vitro*, this colorimetric method was used to detect *Ae. aegypti* salivary proteins from
370 approximately 10 ng of salivary gland extract and 10^5 PFU for ZIKV. Nevertheless, this
371 sensitivity may not be sufficient to detect ZIKV from infected mosquitoes, as the salivary gland
372 and midgut tissues contained arboviral titers as high as 10^4 and 10^5 PFU, respectively. Further
373 studies are required to improve the sensitivity. The authors proposed a potential application of

374 this detection tool (**Figure 5**). The Apt-AuNPs complex can be mixed with a sugar solution that
375 acts as food for mosquitoes trapped in the environment. The mosquitoes then deposit a small
376 amount of saliva in the solution while feeding. If salivary proteins/viral proteins are present,
377 the Apt-AuNPs complex will aggregate and turn red. For detection in the midgut, mosquitoes
378 need to consume the red sugar solution specific to ZIKV containing Apt-AuNPs. If the viral
379 protein is present in the midgut, the red changes to blue, giving the mosquitoes a color code
380 based on the presence or absence of the arbovirus. This innovative and promising concept could
381 greatly contribute to the diagnosis and monitoring of mosquito vectors and arboviruses in the
382 environment. Similar tools could be developed and used on tick extracts collected in the field
383 for TBP surveillance.

384 **4. Aptamers as potential preventive tools against TBDs**

385 There are currently two ways of preventing TBDs: one is to use chemicals to reduce the risk of
386 tick bites and the other, vaccines. However, the use of acaricides or repellents is highly
387 controversial, and access to vaccination is currently very limited for TBDs. The potential of
388 aptamers as tools to prevent TBDs is discussed in this section.

389 **4.1. Chemical Prevention**

390 **4.1.1 Use of acaricides/repellents**

391 Acaricides are very effective in reducing tick populations in limited areas. Permethrin is
392 recommended as this acaricide is lethal to ticks as it affects the nervous system, causing muscle
393 spasms, paralysis, and death (Gammon, 2014; Roßbach et al., 2014). The efficacy of permethrin
394 has been observed on all tick species and life stages (Nodari et al., 2012). Unlike acaricides,
395 repellents do not kill but prevent ticks from attaching to the skin (Agwunobi et al., 2021).
396 However, the high toxicity of chemical acaricides for non-target species (vertebrates and
397 invertebrates) and the environment (bioaccumulation) have called into question their use (Swale
398 et al., 2019). In addition, repeated applications and inappropriate use of acaricides have led to
399 the emergence of resistance in several tick species (Abbas et al., 2014). For example, the most
400 important cattle ticks of the genus *Rhipicephalus* have developed resistance to permethrin and
401 DDT (organochlorine) due to a mutation in the Na⁺ ion channel that reduces its sensitivity to
402 acaricides (Miller et al., 1999).

403 The search for safe and naturally effective products lies at the heart of new drug developments.
404 Ongoing studies are looking into the potential of essential oils as repellents or acaricides due to

405 their ability to inhibit tick feeding behavior through their neurotoxic effects (Benelli et al.,
406 2018). However, most natural products are not yet marketed because they have not yet been
407 proven to be non-toxic, in addition to their short period of action (Selles et al., 2021). Another
408 alternative is the use of microorganisms such as fungi, bacteria, and viruses with
409 entomopathogenic activities (Obaid et al., 2022). This is the case for *Bacillus thuringiensis*, a
410 Gram-positive bacterium capable of producing proteins with insecticidal properties (Fernández-
411 Ruvalcaba et al., 2010). However, its role in controlling tick populations is still poorly
412 documented. The only commercially available product in Europe (Vectobac) showed no
413 efficacy against ticks (Szczepańska et al., 2018). On the other hand, four environmental strains
414 of *B. thuringiensis* caused up to 80% mortality in *I. ricinus* and *Dermacentor reticulatus*
415 (Szczepańska et al., 2018). Although promising, these results need further studies to optimize
416 the use of *B. thuringiensis* for ticks.

417 **4.1.2. Aptamers as a potential alternative to acaricides/repellents**

418 The excessive use of acaricides has negative impacts on the environment and animal health,
419 due to their bioaccumulation and toxicity for non-target species and is consequently misaligned
420 with the One Health approach (Obaid et al., 2022). Aptamers could be an alternative to these
421 chemical products.

422 Aptamers can act as agonists or antagonists, depending on their binding site on the target (Zhou
423 et al., 2017). Commonly used acaricides act on the central nervous system of ticks through a
424 variety of mechanisms (Obaid et al., 2022). For example, organophosphates inhibit
425 cholinesterase, which becomes unable to degrade acetylcholine. As a result, the nervous system
426 is overstimulated, leading to the tick's death (Obaid et al., 2022). Dieldrin is a drug that acts on
427 GABA-gated chloride channel receptors by affecting the channel properties, causing
428 hyperexcitation of the nervous system (Obaid et al., 2022). By selecting aptamers against a
429 specific neurotransmitter/receptor, it would be possible to develop antagonist or agonist
430 aptamers. For instance, no aptamers have yet been selected against neurotransmitters or central
431 nervous receptors specific to arthropods. However, aptamers have been selected against human
432 neurotransmitters such as dopamine and acetylcholine, and their receptors, mainly within the
433 context of research on human neurological diseases (Liang et al., 2022). One study aimed to
434 select aptamers against human brain acetylcholinesterase, for the treatment of Alzheimer's
435 disease. The authors succeeded in selecting three specific aptamers, one of which was an
436 antagonist of acetylcholinesterase (Liang et al., 2022). Another study focused on selecting
437 fluorinated RNA aptamers against GABA_A receptors for the treatment of epilepsy. These

438 aptamers were specific to the closed/open channel forms and were able to inhibit the open-
439 channel receptor (Cui et al., 2004). These studies have shown that aptamers can act on the
440 nervous system in the same way as acaricides/repellents do. The central nervous system of ticks
441 needs to be further explored in order to identify molecules specific to these arthropods. Species-
442 specific molecules could constitute targets for aptamers to avoid targeting other arthropod
443 species. Aptamers could also discriminate different conformational states of the same protein,
444 which may differ from one arthropod to another (Geiger et al., 1996).

445 **4.2 Vaccination**

446 Vaccines are the most effective tools for preventing and controlling TBDs, when other limiting
447 measures are not sufficient. Two strategies can be considered: anti-tick vaccines targeting
448 specific tick species, or vaccines against specific TBPs.

449 **4.2.1 Anti-tick vaccines**

450 In the early 1990s, the first vaccine against ticks, TickGARD™, was developed and marketed
451 in Australia, followed by Gavac™, a vaccine developed in Cuba and marketed in Latin America
452 (Andreotti, 2006). Both vaccines contain a recombinant *R. microplus* protein Bm86 (De la
453 Fuente et al., 1999). However, neither of these vaccines has achieved sustained commercial
454 success: TickGARD™ is no longer available on the market and Gavac™ has limited
455 availability. This limited success can be partly explained by the fact that their efficacy varies
456 according to tick species (de Vos et al., 2001). They also require multiple booster doses and
457 need to be integrated into a management strategy that includes acaricide use.

458 Many studies are currently looking for potential antigenic targets to aid vaccine development.
459 The European ANTIDotE consortium has been set up by various research teams (Sprong et al.,
460 2014). Its objective is to identify antigens from *I. ricinus*, the main tick species in Europe, which
461 could serve as candidates for an anti-tick vaccine that would protect against multiple TBPs.
462 Subolesin has been identified as an antigen of interest for the development of a tick vaccine.
463 This protein is involved in tick innate immune response and in other major pathways, including
464 feeding, fertility, infection and pathogen replication/multiplication. Experimentally,
465 vaccination with recombinant subolesin has proved effective in controlling ticks and infections
466 by several pathogens, including *A. phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*,
467 and *B. burgdorferi* sensu stricto. However, it did not reduce tick infection by TBEV and thus
468 its transmission (Havlíková et al., 2013). Other potential vaccine candidates that look promising
469 affect tick detachment (recombinant 64P), water homeostasis (aquaporin), or the tick's defense

470 against the host immune system (recombinant TSLP1) (Muhanguzi et al., 2022). However, the
471 efficacy of these vaccine candidates depends on the pathogen and the tick species. The
472 challenge of vaccination against TBDs is to identify a single vaccine candidate that would be
473 protective against multiple TBPs (Parizi et al., 2012).

474 More recently, anti-tick microbiota vaccines have been investigated. The tick gut modulates the
475 colonization and replication/multiplication of pathogens, for which it is the first point of entry
476 (Bonnet et al., 2017b). One study identified key bacteria in the tick microbiota
477 (*Enterobacteriaceae* family) using 16S rRNA amplicon sequencing and bacterial network
478 analysis (Mateos-Hernández et al., 2021). An anti-tick microbiota vaccine targeting
479 *Escherichia-Shigella* was administered to mice infected with *Borrelia afzelii*, inducing the
480 production of host antibodies against these bacteria. The whole tick microbiota was affected
481 after tick feeding and resulted in a reduction in the load of *B. afzelii* in the vector, suggesting
482 that *B. afzelii* is sensitive to perturbations in the tick microbiota. These initial results show
483 potential for being able to use anti-microbiota vaccines to control TBPs. Further studies are
484 needed to prove their efficacy and gain a better understanding of the tick microbiota's
485 involvement in the transmission of pathogens. In addition, the question of possible side effects,
486 such as the disruption of host species' own gut microbiota, needs to be addressed.

487 **4.2.2. Anti-tick-borne pathogen vaccines**

488 To prevent the replication and transmission of TBPs, some vaccines for humans and domestic
489 animals have been developed against specific TBPs.

490 At present, only vaccination against TBEV is available in European countries (Pilz et al., 2023).
491 For TBEV, human vaccination is very important as there is currently no specific viral treatment.
492 In European countries, two vaccines based on the Austrian Neudoerfl isolate (FSME-
493 IMMUN®, Pfizer) and the German K23 isolate (Encepur®, GlaxoSmithKline) have a
494 marketing authorization (Hansson et al., 2020). However, the vaccination coverage reported in
495 these countries varies widely. In Austria, the vaccination rate is the highest in the world: 82%
496 of the population is vaccinated (Zavadska et al., 2013). In other endemic countries, vaccination
497 coverage is considered very low, like in the Czech Republic, where only 12 to 23% of the
498 population is vaccinated (Zavadska et al., 2013).

499 Human vaccination against the causative agents of Lyme borreliosis is still under intense
500 investigation and research mainly targets the outer membrane protein OspA. In 1998, the FDA
501 approved a recombinant Lyme vaccine in the USA, based on the recombinant OspA (OspA

502 subtype 1, LYMErix®) (Nigrovic et al., 2007). This vaccine protected only against the most
503 prevalent pathogenic species in the United States, *B. burgdorferi* sensu stricto and reduced the
504 incidence of infection in vaccinated adults by 76% (Poland et al., 2001). After three years of
505 commercialization, this vaccine was withdrawn from the market due to low sales and numerous
506 controversies related to adverse effects and the anti-vaccine sentiment (Skotarczak, 2015).
507 Clinical trials to develop new vaccines against Lyme borreliosis are currently under way.
508 VLA15, developed by Pfizer and Valvena, is currently being tested in phase III human trials.
509 This multivalent vaccine also targets OspA and contains six serotypes (Gomes-Solecki et al.,
510 2020). It could protect against both American and European (sub)species of the *Borrelia*
511 *burgdorferi* sensu lato complex (Bézay et al., 2023). Vaccines against Lyme borreliosis are
512 available for veterinary usage, notably to protect dogs. The Merilym 3™ vaccine (Boehringer)
513 is composed of three inactivated strains found in Europe (*B. afzelii*, *Borrelia garinii*, and
514 *B. burgdorferi* sensu stricto) (Wilczek et al., 2023).

515 It is also possible to vaccinate livestock against TBPs such as *C. burnetii*, the agent of Q fever
516 (Kazar, 2005). Vaccination of dairy goats and sheep against *C. burnetii* has proved highly
517 effective, reducing the bacterial load in the environment and consequently human exposure
518 (Hogerwerf et al., 2011).

519 Vaccination of wildlife should also be considered (Gortazar et al., 2015). The best strategy
520 would be the use of oral bait vaccination, which has shown to be effective in the case of fox
521 rabies in Western Europe (Winkler et al., 1976) and for wild boar vaccination against classical
522 swine fever (Kaden et al., 2002). However, the efficacy of this vaccination depends on many
523 parameters. The formulation must be palatable to the target species, the vaccine must resist
524 inactivation long enough before the bait is consumed, and administration must be closely
525 controlled in order to limit the vaccination of non-target species. Each target species therefore
526 requires the development of a distribution method and specific bait device. The vaccine must
527 be safe for other species. For these reasons, it is particularly difficult to efficiently vaccinate
528 wildlife species, so this method is not currently used for TBD prevention.

529 **4.2.3. The potential vaccine applications of aptamers**

530 The current challenge in TBD vaccination is to identify new antigens using proteomic and
531 transcriptomic studies. Aptamers could be used to identify new molecules. For example, Dong
532 et al. implemented an affinity purification strategy to identify novel proteins involved in DENV
533 replication, using streptavidin-binding aptamers (**Figure 6**) (Dong et al., 2015).

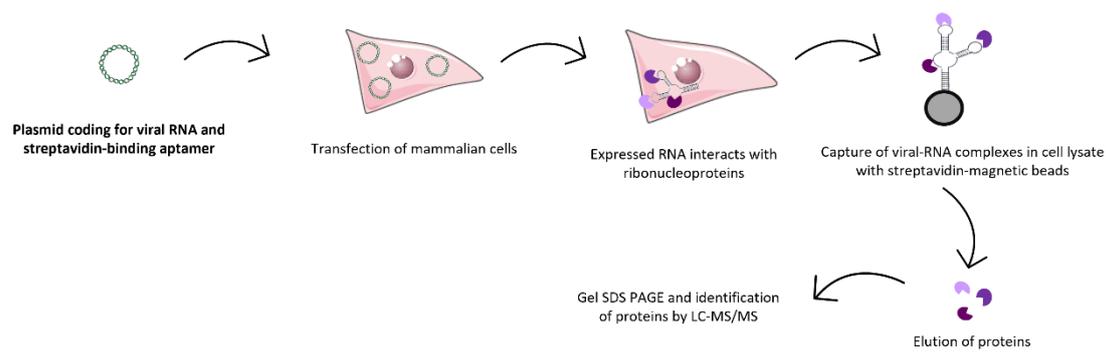


Figure 6 Schematic illustration of a novel affinity purification strategy to discover proteins involved in dengue virus replication, using streptavidin-binding aptamers.

534 The streptavidin-binding RNA aptamer sequence was cloned into a viral plasmid encoding the
 535 dengue virus (tagged RNA). After transfection, the hybrid RNA was transcribed into
 536 mammalian cells (293 T cells), allowing endogenous assembly of the tagged RNA into viral
 537 ribonucleoproteins (vRNPs). The tagged vRNPs were then purified from whole cell extracts
 538 using streptavidin-coated beads; proteins associated with the viral RNA were then identified by
 539 LC-MS/MS spectrometry. This approach revealed several host proteins that interact with
 540 DENV RNA in infected cells, including RPS8 that positively participated in DENV replication
 541 (Dong et al., 2015). A simpler approach entails selecting biotinylated aptamers against the
 542 whole pathogen, such as bacteria, parasites or viral particles. The selected aptamers recognize
 543 a specific molecule that can be eluted after capture on streptavidin-coated beads and then
 544 identified by mass spectroscopy (Cibiel et al., 2014). Aptamers could therefore help identify
 545 new vaccine candidates and/or new therapeutic strategies.

546 Vaccine adjuvants are substances that promote the potency, efficacy, and persistence of
 547 adaptative immune response to an antigen. Aptamers as adjuvants are currently being explored
 548 by several research groups, as they can enter specific cells through a receptor and act as
 549 agonists/antagonists. For example, aptamers could help to activate T cells by presenting
 550 antigens. An RNA aptamer was selected against CD28, a protein expressed on T cells that
 551 provides co-stimulatory signals necessary for T cell activation and survival (Pastor et al., 2013).
 552 The selected aptamer demonstrated an agonist activity on this protein. This aptamer coupled
 553 with an idiotype vaccine was able to enhance the cellular immune response *in vivo* and to
 554 prolong survival of mice (Pastor et al., 2013). Another study selected aptamers against murine
 555 receptor DEC205 present on the surface of CD8 dendritic cells (Wengertter et al., 2014). The
 556 role of these dendritic cells is to present T cell-dependent epitopes to their specific T cell

557 receptors. The selected aptamer conjugated with the model antigen ovalbumin was able to
558 enhance the T cell response by delivering antigens to the dendritic cells. This aptamer could be
559 combined with a vaccine to improve immunity.

560 **5. Aptamers as therapeutic tools**

561 **5.1. Current Treatment of Tick-Borne Pathogens**

562 Most tick-borne bacteria (*Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*, and *Borrelia*) are susceptible to
563 doxycycline, a broad-spectrum antibiotic of the tetracycline class. To date, no case of relapse
564 or antibiotic resistance has been observed for these bacteria (Madison-Antenucci et al., 2020).
565 However, doxycycline is a broad-spectrum antibiotic, which disrupts the microbiome and
566 increases the risk of resistance selection in non-target bacteria. Antibiotics are certainly
567 effective, but their long-term consequences are problematic, not least because of antibiotic
568 resistance. New alternatives are therefore needed.

569 In the case of protozoan infection, antiparasitics are used, such as imidocarb dipropionate for
570 babesiosis. However, treatment is accompanied by side effects in 15% of cases, and several
571 cases of relapsing babesiosis have been reported in immunocompromised patients (Madison-
572 Antenucci et al., 2020). A combination of antiparasitics and an antibiotic is sometimes needed,
573 such as a mixture of buparvaquone and oxytetracycline to treat theileriosis (Ceylan et al., 2021).

574 For tick-borne viruses, infection is usually associated with two phases: an initial phase of non-
575 specific symptoms (e.g., fever, myalgia, and headache), followed by a second phase of more
576 specific symptoms (central nervous system symptoms for instance). In Europe, the current
577 treatment for TBEV is supportive or symptomatic. Ribavirin, also used for the treatment of
578 CCHF, inhibited TBEV propagation in cell culture and led to a dose-dependent reduction in
579 TBEV titers (Tang et al., 2023). However, convincing clinical data is missing, and a specific
580 antiviral therapy is currently unavailable. Given these limitations, the development of new
581 therapeutic tools should be strongly considered, including aptamers.

582 **5.2. Aptamers as new Therapeutic Molecules**

583 A few studies have demonstrated the ability of aptamers to act as anti-bacterial, anti-viral or
584 anti-parasitic agents (Zhou et al., 2017). So far, only one study has developed aptamers as
585 potential therapeutic agents against TBPs. Kondratov et al. (2013) proposed selecting aptamers
586 against a fragment of the TBEV E envelope protein for therapeutic purposes, because this viral

587 protein is the key to the way that TBEV enters cells by binding to the cell receptor (Kondratov
588 et al., 2013). Using molecular modeling, they identified the functional domains of the protein.
589 This target domain was produced recombinantly, and a pool of aptamers was selected after 15
590 selection cycles. The selected aptamers were tested against an isolate of the Siberian subtype
591 TBEV in a pig embryo kidney cell culture for a neutralization assay. A similar neutralization
592 index was obtained with aptamers as that with the virus neutralization test using commercial
593 human immunoglobulin that is currently frequently used in the diagnosis of TBEV. Aptamers
594 selected in this study could be further investigated for therapeutic (inhibitory effect) and
595 diagnostic purposes, to replace immunoglobulin in neutralization assays (Kondratov et al.,
596 2013).

597 To date, very few aptamers have been described as antibacterial agents (Lee et al., 2015). For
598 example, an RNA aptamer was selected against a pilin structural protein of *Salmonella enterica*
599 sbsp. *enterica serovar Typhi*. The interaction between this protein and the selected aptamer
600 reduced the bacterial invasion in human monocytes *in vitro* by 71% (Pan et al., 2005). Based
601 on this result, Pan et al. (2005) concluded that this aptamer could potentially be used as an
602 alternative to antibiotic therapy.

603 Some aptamers have been developed as therapeutic agents for malaria, whose agents, including
604 *Plasmodium falciparum*, are transmitted by mosquitoes. This parasite invades erythrocytes and
605 digests hemoglobin to survive. The released heme is then rapidly detoxified by hemozoin. Niles
606 et al. (2009) showed that heme-binding DNA aptamers interrupted the action of hemozoin, and
607 induced toxicity lethal to the parasite (Niles et al., 2009). When they were grown in red cells
608 with these aptamers, the parasite's growth was significantly lower than that of a control. This
609 strategy could be an alternative to current drugs that act on this pathway, such as chloroquine.
610 Another strategy tested was to target a receptor involved in parasite-host interactions.
611 Cytoadherence of infected erythrocytes to the endothelial surface of the host's CD36 receptor
612 is known to contribute to the accumulation of infected erythrocytes in vital organs. RNA
613 aptamers were isolated against the CD36 receptor present on the surface of endothelial cells,
614 and this binding disrupted interaction with the parasite (Kamarudin et al., 2020). These RNA
615 aptamers could be further investigated as new therapeutic tools due to their ability to reduce
616 cytoadherence. To date, no anti-bacterial or anti-parasitic aptamers have been developed against
617 tick-borne bacteria or protozoa.

618 **5.3. Aptamers Conjugated With Drugs**

619 Aptamers have also been explored as delivery systems for drugs or small oligonucleotides
620 (siRNAs, miRNAs). For example, they can specifically target cancer cells while avoiding
621 toxicity in healthy cells (Chandola et al., 2016). This strategy could be particularly useful for
622 delivering antibiotics to cells infected by *Rickettsia*, *Anaplasma* or *Ehrlichia*, which are strictly
623 intracellular tick-borne bacteria. For example, antimicrobial peptides are an effective
624 alternative for the treatment of diseases induced by multidrug-resistant bacteria, but their use is
625 limited because of their short lifespan and poor penetration of cells. An antimicrobial peptide
626 called HPA3P_{his} was conjugated with a DNA aptamer specific to *Vibrio vulnificus* (Afrasiabi et
627 al., 2020). The complex was able to degrade bacteria by destroying the membrane integrity and
628 to specifically deliver the drug.

629 **6. Conclusion**

630 The incidence and emergence of TBDs have been steadily increasing since the early 20th
631 century, mainly due to the effects of human activities that disrupt ecosystems (Madison-
632 Antenucci et al., 2020). Ticks transmit a wide variety of infectious agents (bacteria, parasites,
633 and viruses), thus inducing major public and animal health problems worldwide. The current
634 fight against TBDs should be based on a One Health approach but this is difficult to implement
635 on all levels. Current control methods are inadequate in terms of screening, diagnosis,
636 surveillance, prevention, and treatment control. They also face a number of obstacles, including
637 complex natural transmission cycles and TBPs that are difficult to handle in the laboratory (e.g.,
638 lack of study tools and difficulty in implementing culture and isolation methods). In this review,
639 we have shown that aptamers could be innovative tools for TBD control. Encouraging results
640 have been obtained for their use in the detection of TBPs (**Table 2**). Their selection method is
641 complex, but more and more variants of SELEX exist to reduce time and improve the efficiency
642 of the technique, through the development of robotic platforms (Kohlberger and Gadermaier,
643 2022). Their low bioavailability is a major obstacle to their therapeutic application but can be
644 potentially overcome by the insertion of chemical modifications, which can limit their
645 degradation by nucleases and their renal filtration. By adapting aptamer technology to the
646 specific challenges related to TBDs, the next few years should see the development of aptamers
647 for screening, early and sensitive diagnosis, as well as for preventive and therapeutic tools.

648
649
650
651

Tables

Table 1 Main zoonotic TBDs in Europe

<u>Tick-borne diseases</u>	<u>Pathogens</u>	<u>Main transmission routes</u>	<u>Vectors</u>	<u>Reservoir Hosts</u>	<u>Spillover hosts</u>	<u>Medical consequences</u>	
						<u>For domestic animals</u>	<u>For humans</u>
Tick-borne viruses							
Crimean-Congo hemorrhagic fever	CCHFV (<i>Nairovirus</i>)	Tick bite (nosocomial transmission)	<i>Hyalomma marginatum</i>	Ticks and wild mammals		No clinical signs described	Frequently asymptomatic. Very severe clinical forms: hemorrhagic fevers reaching 40-50% lethality
Tick-borne encephalitis	TBEV (<i>Flavivirus</i>)	Tick bite, foodborne contamination (milk and raw products)	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Ticks and wild mammals	Ruminants	Rare clinical cases, especially in dogs, often lethal	Biphasic disease (febrile syndrome followed by meningitis and/or encephalitis). Less severe outcome with TBEV-Eu subtype present in the EU than with the 2 subtypes present in Eastern Europe
Tick-borne bacteria							
Borreliosis/ Tick-borne relapsing fever	<i>Borrelia duttonii</i> , <i>B. miyamotoi</i>	Tick bite	<i>Ornithodoros</i> spp. <i>Ixodes</i> spp.	Rodents		No clinical signs described	Severe febrile syndrome with macular or purpuric erythema and possible neurological complications. Up to 10 possible recurrences.
Granulocytic anaplasmosis	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Tick bite	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Not identified in Europe		Europe: hyperthermia, agalactia, weight loss, lameness, secondary infections, abortions in ruminants. In dogs and horses: flu-like syndrome.	Europe: flu-like syndrome (less severe than in the USA)

Lyme borreliosis	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	Tick bite	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Small mammals, birds, reptiles		Dogs: arthritis, fever, anorexia, nephritis Cattle: rare clinical cases, arthritis Horses: asymptomatic, fever, arthritis	Classically: erythema migrans. Secondary phase: location partly depending on the species: cutaneous (<i>B. afzelii</i>), joints (<i>B. burgdorferi</i> s.s.), neurological (<i>B. garini</i>)
Mediterranean spotted fever	<i>Rickettsia conorii</i>	Tick bite	<i>R. sanguineus</i>	Ticks, rodents, wild rabbits, dogs?	Dogs?	Dog: rare clinical cases, with impairment of general condition, adenomegaly, back pain and even melena	Fever, "black spot" at the site of the tick bite, adenopathy, followed by generalized rash and vascular lesions. Rare cases of multiple organ failure.
Q fever	<i>Coxiella burnettii</i>	Airborne, tick bite	<i>Rhipicephalus</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp.	Wild mammals, ticks	Ruminants	Frequently asymptomatic. Abortions and mastitis, especially in ruminants.	Frequently asymptomatic. If symptomatic: flu-like febrile form to severe pneumonia, hepatitis, abortions, endocarditis, especially if there is pre-existing valve disease
Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA)	<i>Rickettsia slovaca</i> , <i>R. raoultii</i> , <i>R. rioja</i>	Tick bite	<i>Dermacentor</i> spp.	Not clearly identified (deer and wild boars suspected)		No clinical signs described	Infrequent disease. Inoculation sore, fever, asthenia, arthralgias, adenopathy and sometimes maculopapular rash
Tularemia	<i>Francisella tularensis</i>	Contact, water ingestion, tick bite, airborne transmission	<i>D. reticulatus</i> , <i>I. ricinus</i> <i>Haemaphysalis concinna</i>	Rodents, other small mammals, ticks	Hares	Fatal septicemic disease in hares and certain rodents	Sudden fever, which may progress to one of the following forms: ulceroganglionic, oculo-ganglionic, pharyngeal, pulmonary.

<u>Tick-borne diseases</u>	<u>Pathogens</u>	<u>Main transmission routes</u>	<u>Vectors</u>	<u>Reservoir Hosts</u>	<u>Spillover hosts</u>	<u>Medical consequences</u>	
						<u>For domestic animals</u>	<u>For humans</u>
Tick-borne parasite							
Babesiosis	<i>Babesia</i> spp.	Tick bite	<i>I. ricinus</i>	Cattle, rodents, deer		High fever, hemolytic anemia, more severe with certain species	Very rare, asymptomatic or non-specific symptoms
Theileriosis	<i>Theileria</i> spp.	Tick bite	<i>Rhipicephalus</i> spp. <i>Hyalomma</i> spp.	Cattle		A few cases in South Portugal. Fever, anemia, tachypnea, depression, lethargy, jaundice, often leading to death. Abortion and stillbirths possible for pregnant cows.	Not zoonotic

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

Table 2 Current aptamers selected against TBPs and their future applications.

Tick-borne pathogens	Target	Current use	Future application	References
Tick-borne viruses				
CCHF virus	Nucleocapsid protein (recombinant)	Antibody-aptamer sandwich assay Better threshold than antigen capture by ELISA and RT-PCR	Detection in biological samples	Jalali et al., 2012
CCHF virus	CCHF viral particles	Aptamers coupled to streptavidin-magnetic beads Detection by a reporter aptamer coupled with a fluorescent dye Capture of viral particles	Detection in biological samples	Bruno et al., 2012
TBEV	TBEV viral particles	Aptamer coupled with microspheres (2 µm) Capture and sorting of viral particles	Detection in biological samples combined with other methods (e.g. RT-PCR) Differential diagnosis with Dengue virus	Liu et al., 2023
TBEV	TBEV E protein surface (recombinant)	Aptamer used for neutralization assay Similar to the current neutralization assay using immunoglobulin	Therapeutic (inhibitory effect) and detection (neutralization assay and/or capture of virion)	Kondratov et al., 2013
Tick-borne bacteria				
<i>B. burgdorferi</i>	OspA (outer membrane protein) (recombinant)	Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) combined with aptamers	Detection in biological samples	Tabb et al., 2022
<i>F. tularensis</i>	Mixture of antigens from <i>F. tularensis</i> subspecies <i>japonica</i>	ALISA Demonstrated superiority over current ELISA	Detection in biological samples	Vivekananda et al., 2006
<i>F. tularensis</i>	<i>F. tularensis</i>	Aptamer conjugated with magnetic beads and combined with real-time PCR	Enrichment and detection in contaminated environment and food (lettuce, soil, etc.)	Lamont et al., 2014
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>R. typhi</i> purified on a density gradient	Fluorescent enzyme-linked aptamer-magnetic bead sandwich assay Cannot discriminate <i>Rickettsia</i> spp.	Detection in biological samples, PBS, tick homogenate	Bruno et al., 2016

666 **Author contributions**

667

668 **Lisa Lucie Le Dortz:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing-original draft
669 preparation, Writing- review and editing, Visualization. **Clotilde Rouxel:** Writing- review and
670 editing. **Henri-Jean Boulouis:** Writing- review and editing, Supervision, Project
671 administration, Funding acquisition. **Anne-Claire Lagrée:** Writing- review and editing,
672 Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Pierre Lucien Deshuillers:** Writing-
673 review and editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Nadia Haddad:**
674 Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing- review and editing, Visualization,
675 Supervision, Project administration, Funding acquisition.

676 **Conflicts of Interest**

677

678 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or
679 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

680 **Funding**

681

682 This work was partially funded by the Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (EnvA) and was
683 supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety
684 (ANSES). LLD was funded by ABIES from AgroParisTech. UMR BIPAR is supported by the
685 French Government's "Investissement d'Avenir" program, Laboratoire d'Excellence
686 "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant No. ANR-10-LABEX-62-
687 IBEID).

688 **References**

689

- 690 Abbas, R.Z., Zaman, M.A., Colwell, D.D., Gilleard, J., Iqbal, Z., 2014. Acaricide resistance in
691 cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Vet. Parasitol.* 203, 6–
692 20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>
- 693 Afrasiabi, S., Pourhajibagher, M., Raoofian, R., Tabar zad, M., Bahador, A., 2020. Therapeutic
694 applications of nucleic acid aptamers in microbial infections. *J. Biomed. Sci.* 27, 6.
695 <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0611-0>
- 696 Agüero-Rosenfeld, M.E., Wang, G., Schwartz, I., Wormser, G.P., 2005. Diagnosis of Lyme
697 Borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 484–509. [https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.484-
698 509.2005](https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.484-509.2005)

699 Agwunobi, D.O., Yu, Z., Liu, J., 2021. A retrospective review on ixodid tick resistance against
700 synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and
701 mitigation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 173, 104776.
702 <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104776>

703 Aita, T., Sando, E., Katoh, S., Hamaguchi, S., Fujita, H., Kurita, N., 2023. Serological cross-
704 reactivity between spotted fever and typhus groups of rickettsia infection in Japan. *Int.*
705 *J. Infect. Dis.* 130, 178–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.03.012>

706 Alcon-Chino, M.E.T., De-Simone, S.G., 2022. Recent Advances in the Immunologic Method
707 Applied to Tick-Borne Diseases in Brazil. *Pathog. Basel Switz.* 11, 870.
708 <https://doi.org/10.3390/pathogens11080870>

709 Andreotti, R., 2006. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using
710 crossbreed bovines in stall test. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Braz. J. Vet. Parasitol. Orgao*
711 *Of. Col. Bras. Parasitol. Vet.* 15, 97–100.

712 Arstila, P.P., Halonen, P.E., 1988. Direct Antigen Detection, in: *Laboratory Diagnosis of*
713 *Infectious Diseases Principles and Practice.* Springer New York, New York, NY, pp.
714 60–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3900-0_4

715 Bakheit, M.A., Seitzer, U., Mbat, P.A., Ahmed, J.S., 2007. Serological diagnostic tools for the
716 major tick-borne protozoan diseases of livestock. *Parassitologia* 49 Suppl 1, 53–62.

717 Beall, M.J., Mainville, C.A., Arguello-Marin, A., Clark, G., Lemieux, C., Saucier, J., Thatcher,
718 B., Breitschwerdt, E.B., Cohn, L.A., Qurollo, B.A., Chandrashekar, R., 2022. An
719 Improved Point-of-Care ELISA for the Diagnosis of Anaplasmosis and Ehrlichiosis
720 During the Acute Phase of Tick-Borne Infections in Dogs. *Top. Companion Anim. Med.*
721 51, 100735. <https://doi.org/10.1016/j.tcam.2022.100735>

722 Benelli, G., Pavela, R., 2018. Repellence of essential oils and selected compounds against
723 ticks—A systematic review. *Acta Trop.* 179, 47–54.
724 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.025>

725 Bézay, N., Hochreiter, R., Kadlec, V., Wressnigg, N., Larcher-Senn, J., Klingler, A.,
726 Dubischar, K., Eder-Lingelbach, S., Leroux-Roels, I., Leroux-Roels, G., Bender, W.,
727 2023. Safety and immunogenicity of a novel multivalent OspA-based vaccine candidate
728 against Lyme borreliosis: a randomised, phase 1 study in healthy adults. *Lancet Infect.*
729 *Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00210-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00210-4)

730 Bonnet, S., Huber, K., Joncour, G., René-Martellet, M., Stachurski, F., Zenner, L., 2017. 2.
731 Biologie des tiques, in: Boulanger, N., McCoy, K.D. (Eds.), *Tiques et maladies à tiques :*
732 *Biologie, écologie évolutive, épidémiologie, Didactiques.* IRD Éditions, Marseille, pp.
733 53–84. <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.9020>

734 Bonnet, S.I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A.M., Duron, O., 2017. The Tick Microbiome:
735 Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen
736 Transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 236.
737 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00236>

738 Bosak, A., Saraf, N., Willenberg, A., C. Kwan, M.W., W. Alto, B., W. Jackson, G.,
739 H. Batchelor, R., D. Nguyen-Huu, T., Sankarapani, V., D. Parks, G., Seal, S.,
740 Jay Willenberg, B., 2019. Aptamer–gold nanoparticle conjugates for the colorimetric
741 detection of arboviruses and vector mosquito species. *RSC Adv.* 9, 23752–23763.
742 <https://doi.org/10.1039/C9RA02089F>

743 Bouvier-Müller, A., Ducongé, F., 2018. Application of aptamers for in vivo molecular imaging
744 and theranostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Aptamers in Therapeutics and Drug Delivery
745 134, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.004>

746 Bruno, J.G., Carrillo, M.P., Richarte, A.M., Phillips, T., Andrews, C., Lee, J.S., 2012.
747 Development, screening, and analysis of DNA aptamer libraries potentially useful for
748 diagnosis and passive immunity of arboviruses. *BMC Res. Notes* 5, 633.
749 <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-633>

750 Bruno, J.G., Chao, C.-C., Zhang, Z., Ching, W.-M., Phillips, T., Edge, A., Sivils, J.C., 2016.
751 Preliminary Development of an Enzyme-Linked Fluorescent DNA Aptamer-Magnetic
752 Bead Sandwich Assay for Sensitive Detection of Rickettsia Cells. *Aptamers Synth.*
753 *Antibodies*.

754 Burn, L., Tran, T.M.P., Pilz, A., Vyse, A., Fletcher, M.A., Angulo, F.J., Gessner, B.D., Moïsi,
755 J.C., Jodar, L., Stark, J.H., 2023. Incidence of Lyme Borreliosis in Europe from National
756 Surveillance Systems (2005-2020). *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* 23, 156–
757 171. <https://doi.org/10.1089/vbz.2022.0071>

758 Černý, J., Lynn, G., Hrnková, J., Golovchenko, M., Rudenko, N., Grubhoffer, L., 2020.
759 Management Options for Ixodes ricinus-Associated Pathogens: A Review of Prevention
760 Strategies. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 17, 1830.
761 <https://doi.org/10.3390/ijerph17061830>

762 Ceylan, O., Xuan, X., Sevinc, F., 2021. Primary Tick-Borne Protozoan and Rickettsial
763 Infections of Animals in Turkey. *Pathogens* 10, 231.
764 <https://doi.org/10.3390/pathogens10020231>

765 Chan, K.Y., Kinghorn, A.B., Hollenstein, M., Tanner, J.A., 2022. Chemical Modifications for
766 a Next Generation of Nucleic Acid Aptamers. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 23,
767 e202200006. <https://doi.org/10.1002/cbic.202200006>

768 Chandola, C., Kalme, S., Casteleijn, M.G., Urtti, A., Neerathilingam, M., 2016. Application of
769 aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging. *J. Biosci.* 41, 535–561.
770 <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9632-y>

771 Cibiel, A., Nguyen Quang, N., Gombert, K., Thézé, B., Garofalakis, A., Ducongé, F., 2014.
772 From Ugly Duckling to Swan: Unexpected Identification from Cell-SELEX of an Anti-
773 Annexin A2 Aptamer Targeting Tumors. *PLoS ONE* 9, e87002.
774 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087002>

775 Cui, Y., Rajasethupathy, P., Hess, G.P., 2004. Selection of stable RNA molecules that can
776 regulate the channel-opening equilibrium of the membrane-bound gamma-
777 aminobutyric acid receptor. *Biochemistry* 43, 16442–16449.
778 <https://doi.org/10.1021/bi048667b>

779 de la Fuente, J., Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., García-García, J.C., Méndez, L.,
780 Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boué, O., Machado, H.,
781 Lleonart, R., 1999. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the
782 Bm86-based vaccine GavacTM. *Genet. Anal. Biomol. Eng.* 15, 143–148.
783 [https://doi.org/10.1016/S1050-3862\(99\)00018-2](https://doi.org/10.1016/S1050-3862(99)00018-2)

784 de Vos, S., Zeinstra, L., Taoufik, O., Willadsen, P., Jongejan, F., 2001. Evidence for the utility
785 of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species.
786 *Exp. Appl. Acarol.* 25, 245–261. <https://doi.org/10.1023/a:1010609007009>

787 Diuk-Wasser, M.A., VanAcker, M.C., Fernandez, M.P., 2021. Impact of Land Use Changes
788 and Habitat Fragmentation on the Eco-epidemiology of Tick-Borne Diseases. *J. Med.*
789 *Entomol.* 58, 1546–1564. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa209>

790 Dong, Y., Yang, J., Ye, W., Wang, Y., Ye, C., Weng, D., Gao, H., Zhang, F., Xu, Z., Lei, Y.,
791 2015. Isolation of Endogenously Assembled RNA-Protein Complexes Using Affinity
792 Purification Based on Streptavidin Aptamer S1. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 22456–22472.
793 <https://doi.org/10.3390/ijms160922456>

794 Ellington, A., Szostak, J., 1990. In Vitro Selection of RNA Molecules that Bind Specific
795 Ligands. *Nature* 346, 818–22. <https://doi.org/10.1038/346818a0>

796 Estrada-Peña, A., Ayllón, N., de la Fuente, J., 2012. Impact of Climate Trends on Tick-Borne
797 Pathogen Transmission. *Front. Physiol.* 3, 64.
798 <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00064>

799 Famulok, M., Mayer, G., 2014. Aptamers and SELEX in Chemistry & Biology. *Chem. Biol.*
800 21, 1055–1058. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.08.003>

801 Fernández-Ruvalcaba, M., Peña-Chora, G., Romo-Martínez, A., Hernández-Velázquez, V., de
802 Parra, A.B., De La Rosa, D.P., 2010. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* Pathogenicity
803 for a Strain of the Tick, *Rhipicephalus microplus*, Resistant to Chemical Pesticides. *J.*
804 *Insect Sci.* 10, 186. <https://doi.org/10.1673/031.010.14146>

805 Gammon, D.W., 2014. Permethrin, in: Wexler, P. (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (Third
806 Edition). Academic Press, Oxford, pp. 808–811. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00180-9>

808 Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A., Famulok, M., 1996. RNA Aptamers
809 That Bind l-Arginine with Sub-Micromolar Dissociation Constants and High
810 Enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.* 24, 1029–1036.
811 <https://doi.org/10.1093/nar/24.6.1029>

812 Gocko, X., Lenormand, C., Lemogne, C., Bouiller, K., Gehanno, J.-F., Rabaud, C., Perrot, S.,
813 Eldin, C., De Broucker, T., Roblot, F., Toubiana, J., Sellal, F., Vuillemet, F., Sordet, C.,
814 Fantin, B., Lina, G., Sobas, C., Jaulhac, B., Figoni, J., Chirouze, C., Hansmann, Y.,
815 Hentgen, V., Caumes, E., Dieudonné, M., Picone, O., Bodaghi, B., Gangneux, J.-P.,
816 Degeilh, B., Partouche, H., Saunier, A., Sotto, A., Raffetin, A., Monsuez, J.-J., Michel,
817 C., Boulanger, N., Cathebras, P., Tattevin, P., 2019. Lyme borreliosis and other tick-
818 borne diseases. Guidelines from the French scientific societies. *Médecine Mal. Infect.*
819 49, 296–317. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.05.006>

820 Gomes-Solecki, M., Arnaboldi, P.M., Backenson, P.B., Benach, J.L., Cooper, C.L., Dattwyler,
821 R.J., Diuk-Wasser, M., Fikrig, E., Hovius, J.W., Laegreid, W., Lundberg, U., Marconi,
822 R.T., Marques, A.R., Molloy, P., Narasimhan, S., Pal, U., Pedra, J.H.F., Plotkin, S.,
823 Rock, D.L., Rosa, P., Telford, S.R., III, Tsao, J., Yang, X.F., Schutzer, S.E., 2020.
824 Protective Immunity and New Vaccines for Lyme Disease. *Clin. Infect. Dis.* 70, 1768–
825 1773. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz872>

826 Gondard, M., Michelet, L., Nisavanh, A., Devillers, E., Delannoy, S., Fach, P., Aspan, A.,
827 Ullman, K., Chirico, J., Hoffmann, B., van der Wal, F.J., de Koeijer, A., van Solt-Smits,
828 C., Jahfari, S., Sprong, H., Mansfield, K.L., Fooks, A.R., Klitgaard, K., Bødker, R.,
829 Moutailler, S., 2018. Prevalence of tick-borne viruses in *Ixodes ricinus* assessed by
830 high-throughput real-time PCR. *Pathog. Dis.* 76. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty083>

831 Gortazar, C., Diez-Delgado, I., Barasona, J.A., Vicente, J., De La Fuente, J., Boadella, M.,
832 2015. The Wild Side of Disease Control at the Wildlife-Livestock-Human Interface: A
833 Review. *Front. Vet. Sci.* 1.

834 Hall-Mendelin, S., Ritchie, S.A., Johansen, C.A., Zborowski, P., Cortis, G., Dandridge, S., Hall,
835 R.A., van den Hurk, A.F., 2010. Exploiting mosquito sugar feeding to detect mosquito-
836 borne pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11255–11259.
837 <https://doi.org/10.1073/pnas.1002040107>

838 Hansson, K.E., Rosdahl, A., Insulander, M., Vene, S., Lindquist, L., Gredmark-Russ, S.,
839 Askling, H.H., 2020. Tick-borne Encephalitis Vaccine Failures: A 10-year
840 Retrospective Study Supporting the Rationale for Adding an Extra Priming Dose in
841 Individuals Starting at Age 50 Years. *Clin. Infect. Dis.* 70, 245–251.
842 <https://doi.org/10.1093/cid/ciz176>

843 Havlíková, S., Ličková, M., Ayllón, N., Roller, L., Kazimírová, M., Slovák, M., Moreno-Cid,
844 J.A., Pérez de la Lastra, J.M., Klempa, B., de la Fuente, J., 2013. Immunization with
845 recombinant subolesin does not reduce tick infection with tick-borne encephalitis virus
846 nor protect mice against disease. *Vaccine* 31, 1582–1589.
847 <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.017>

848 Hogerwerf, L., van den Brom, R., Roest, H.I.J., Bouma, A., Vellema, P., Pieterse, M., Dercksen,
849 D., Nielen, M., 2011. Reduction of *Coxiella burnetii* Prevalence by Vaccination of
850 Goats and Sheep, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 379–386.
851 <https://doi.org/10.3201/eid1703.101157>

852 Ismail, N., Bloch, K.C., McBride, J.W., 2010. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *Clin.*
853 *Lab. Med.* 30, 261–292. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.004>

854 Jalali, T., Salehi-Vaziri, M., Pouriayeali, M.H., Gargari, S.L.M., 2021. Aptamer based
855 diagnosis of crimean-congo hemorrhagic fever from clinical specimens. *Sci. Rep.* 11,
856 12639. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91826-8>

857 Kaden, V., Heyne, H., Kiupel, H., Letz, W., Kern, B., Lemmer, U., Gossger, K., Rothe, A.,
858 Böhme, H., Tyrpe, P., 2002. Oral immunisation of wild boar against classical swine
859 fever: concluding analysis of the recent field trials in Germany. *Berl. Munch. Tierarztl.*
860 *Wochenschr.* 115, 179–185.

861 Kamarudin, N.A.A.N., Sat, J.N.A., Zaidi, N.F.M., Mustaffa, K.M.F., 2020. Evolution of
862 specific RNA aptamers via SELEX targeting recombinant human CD36 protein: A
863 candidate therapeutic target in severe malaria. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 10, 23.
864 <https://doi.org/10.4103/2221-1691.273091>

865 Kazar, J., 2005. *Coxiella burnetii* Infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063, 105–114.
866 <https://doi.org/10.1196/annals.1355.018>

867 Keefe, A.D., Pai, S., Ellington, A., 2010. Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9,
868 537–550. <https://doi.org/10.1038/nrd3141>

869 Kim, S., Samanta, K., Nguyen, B.T., Mata-Robles, S., Richer, L., Yoon, J.-Y., Gomes-Solecki,
870 M., 2023. A portable immunosensor provides sensitive and rapid detection of *Borrelia*
871 *burgdorferi* antigen in spiked blood. *Sci. Rep.* 13, 7546. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34108-9>

872

873 Kipp, E.J., Lindsey, L.L., Khoo, Benedict.S., Faulk, C., Oliver, J.D., Larsen, P.A., 2021.
874 Enabling metagenomic surveillance for bacterial tick-borne pathogens using nanopore
875 sequencing with adaptative sampling. *bioRxiv*.

876 Kohlberger, M., Gadermaier, G., 2022. SELEX: Critical factors and optimization strategies for
877 successful aptamer selection. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 69, 1771–1792.
878 <https://doi.org/10.1002/bab.2244>

879 Kondratov, I.G., Khasnatinov, M.A., Potapova, U.V., Potapov, V.V., Levitskii, S.A., Leonova,
880 G.N., Pavlenko, E.V., Solovarov, I.S., Denikina, N.N., Kulakova, N.V., Belikov, S.I.,
881 2013. Obtaining aptamers to a fragment of surface protein E of tick-borne encephalitis
882 virus. *Dokl. Biochem. Biophys.* 448, 19–21.
883 <https://doi.org/10.1134/S1607672913010067>

884 Kovacevic, K.D., Gilbert, J.C., Jilma, B., 2018. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and
885 safety of aptamers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 134, 36–50.
886 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.008>

887 Krupka, M., Raska, M., Belakova, J., Stuchlova Horynova, M., Novotny, R., Weigl, E., 2008.
888 Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia*
889 *burgdorferi* species group. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc*
890 *Czechoslov.* 151, 175–86. <https://doi.org/10.5507/bp.2007.032>

891 Lamont, E.A., Wang, P., Enomoto, S., Borewicz, K., Abdallah, A., Isaacson, R.E., Sreevatsan,
892 S., 2014. A Combined Enrichment and Aptamer Pulldown Assay for *Francisella*
893 *tularensis* Detection in Food and Environmental Matrices. *PLoS ONE* 9, e114622.
894 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114622>

895 Lee, S.-C., Gedi, V., Ha, N.-R., Cho, J.-H., Park, H.-C., Yoon, M.-Y., 2015. Development of
896 receptor-based inhibitory RNA aptamers for anthrax toxin neutralization. *Int. J. Biol.*
897 *Macromol.* 77, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.043>

898 Liang, Z., Li, X., Luo, X., Luo, H., Chen, Y., Cai, M., Zhong, X., Fang, Y., Guo, T., Shi, Y.,
899 Zhang, X., 2022. The Aptamer Ob2, a novel AChE inhibitor, restores cognitive deficits
900 and alleviates amyloidogenesis in 5×FAD transgenic mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids*
901 28, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.02.018>

902 Liu, X., Chen, X., Dong, Y., Zhang, C., Qu, X., Lei, Y., Jiang, Z., Wei, X., 2023. Multiple virus
903 sorting based on aptamer-modified microspheres in a TSAW device. *Microsyst.*
904 *Nanoeng.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41378-023-00523-1>

905 Liu, X., Liu, J., 2021. Biosensors and sensors for dopamine detection. *VIEW* 2, 20200102.
906 <https://doi.org/10.1002/VIW.20200102>

907 Luo, Y., Xie, Y., Xiao, Y., 2021. Laboratory Diagnostic Tools for Syphilis: Current Status and
908 Future Prospects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10.

909 Madison-Antenucci, S., Kramer, L.D., Gebhardt, L.L., Kauffman, E., 2020. Emerging Tick-
910 Borne Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 33, e00083-18.
911 <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-18>

912 Mateos-Hernández, L., Obregón, D., Wu-Chuang, A., Maye, J., Bornères, J., Versillé, N., de la
913 Fuente, J., Díaz-Sánchez, S., Bermúdez-Humarán, L.G., Torres-Maravilla, E., Estrada-
914 Peña, A., Hodžić, A., Šimo, L., Cabezas-Cruz, A., 2021. Anti-Microbiota Vaccines
915 Modulate the Tick Microbiome in a Taxon-Specific Manner. *Front. Immunol.* 12,
916 704621. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.704621>

917 Michelet, L., Delannoy, S., Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M., Chirico, J.,
918 van der Wal, F.J., Sprong, H., Boye Pihl, T.P., Klitgaard, K., Bødker, R., Fach, P.,
919 Moutailler, S., 2014. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe.
920 *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4.

921 Migné, C.V., Beck, C., Gonzalez, G., Lecollinet, S., Moutailler, S., 2021. [Which tools for
922 monitoring emerging arboviruses within their mammalian hosts and arthropod
923 vectors?]. *Viol. Montrouge Fr.* 25, 12–28. <https://doi.org/10.1684/vir.2021.0880>

924 Miller, R.J., Davey, R.B., George, J.E., 1999. Characterization of Pyrethroid Resistance and
925 Susceptibility to Coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J.*
926 *Med. Entomol.* 36, 533–538. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.5.533>

927 Moutailler, S., Yousfi, L., Mousson, L., Devillers, E., Vazeille, M., Vega-Rúa, A., Perrin, Y.,
928 Jourdain, F., Chandre, F., Cannet, A., Chantilly, S., Restrepo, J., Guidez, A., Dusfour,
929 I., Vieira Santos de Abreu, F., Pereira Dos Santos, T., Jiolle, D., Visser, T.M.,
930 Koenraadt, C.J.M., Wongsokarijo, M., Diallo, M., Diallo, D., Gaye, A., Boyer, S.,
931 Duong, V., Piorkowski, G., Paupy, C., Lourenco de Oliveira, R., de Lamballerie, X.,
932 Failloux, A.-B., 2019. A New High-Throughput Tool to Screen Mosquito-Borne
933 Viruses in Zika Virus Endemic/Epidemic Areas. *Viruses* 11, 904.
934 <https://doi.org/10.3390/v11100904>

935 Muhanguzi, D., Ndekezi, C., Nkamwesiga, J., Kalayou, S., Ochwo, S., Vuyani, M., Kimuda,
936 M.P., 2022. Anti-Tick Vaccines: Current Advances and Future Prospects, in: Thomas,
937 S. (Ed.), *Vaccine Design: Methods and Protocols, Volume 2. Vaccines for Veterinary*
938 *Diseases, Methods in Molecular Biology.* Springer US, New York, NY, pp. 253–267.
939 https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1888-2_15

940 Mysterud, A., Jore, S., Østerås, O., Viljugrein, H., 2017. Emergence of tick-borne diseases at
941 northern latitudes in Europe: a comparative approach. *Sci. Rep.* 7, 16316.
942 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15742-6>

943 Nigrovic, L.E., Thompson, K.M., 2007. The Lyme vaccine: a cautionary tale. *Epidemiol. Infect.*
944 135, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0950268806007096>

945 Niles, J.C., Derisi, J.L., Marletta, M.A., 2009. Inhibiting *Plasmodium falciparum* growth and
946 heme detoxification pathway using heme-binding DNA aptamers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
947 *U. S. A.* 106, 13266–13271. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906370106>

948 Nodari, E.F., Roma, G.C., Furquim, K.C.S., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I., 2012.
949 Action of permethrin on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)
950 semi-engorged females: morpho-physiological evaluation of salivary glands. *Ticks*
951 *Tick-Borne Dis.* 3, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.03.008>

952 Obaid, M.K., Islam, N., Alouffi, A., Khan, A.Z., da Silva Vaz, I., Tanaka, T., Ali, A., 2022.
953 Acaricides Resistance in Ticks: Selection, Diagnosis, Mechanisms, and Mitigation.
954 *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12.

955 Ott, D., Ulrich, K., Ginsbach, P., Öhme, R., Bock-Hensley, O., Falk, U., Teinert, M., Lenhard,
956 T., 2020. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalence in field-collected ticks
957 (*Ixodes ricinus*) and phylogenetic, structural and virulence analysis in a TBE high-risk
958 endemic area in southwestern Germany. *Parasit. Vectors* 13, 303.
959 <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04146-7>

960 Ozturk, M., Nilsen-Hamilton, M., Ilgu, M., 2021. Aptamer Applications in Neuroscience.
 961 Pharmaceuticals 14, 1260. <https://doi.org/10.3390/ph14121260>

962 Pan, Q., Zhang, X.-L., Wu, H.-Y., He, P.-W., Wang, F., Zhang, M.-S., Hu, J.-M., Xia, B., Wu,
 963 J., 2005. Aptamers that preferentially bind type IVB pili and inhibit human monocytic-
 964 cell invasion by *Salmonella enterica* serovar typhi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49,
 965 4052–4060. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4052-4060.2005>

966 Parizi, L.F., Githaka, N.W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., da Silva Vaz, I.,
 967 2012. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. *Vet. J.*
 968 194, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.05.023>

969 Pastor, F., Soldevilla, M.M., Villanueva, H., Kolonias, D., Inoges, S., de Cerio, A.L., Kandzia,
 970 R., Klimyuk, V., Gleba, Y., Gilboa, E., Bendandi, M., 2013. CD28 aptamers as powerful
 971 immune response modulators. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2, e98.
 972 <https://doi.org/10.1038/mtna.2013.26>

973 Piantadosi, A., Mukerji, S.S., Ye, S., Leone, M.J., Freimark, L.M., Park, D., Adams, G.,
 974 Lemieux, J., Kanjilal, S., Solomon, I.H., Ahmed, A.A., Goldstein, R., Ganesh, V.,
 975 Ostrem, B., Cummins, K.C., Thon, J.M., Kinsella, C.M., Rosenberg, E., Frosch, M.P.,
 976 Goldberg, M.B., Cho, T.A., Sabeti, P., 2021. Enhanced Virus Detection and
 977 Metagenomic Sequencing in Patients with Meningitis and Encephalitis. *mBio* 12,
 978 10.1128/mbio.01143-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.01143-21>

979 Pilz, A., Erber, W., Schmitt, H.-J., 2023. Vaccine uptake in 20 countries in Europe 2020: Focus
 980 on tick-borne encephalitis (TBE). *Ticks Tick-Borne Dis.* 14, 102059.
 981 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102059>

982 Poland, G.A., Jacobson, R.M., 2001. The prevention of Lyme disease with vaccine. *Vaccine*
 983 19, 2303–2308. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00520-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00520-X)

984 Porretta, D., Mastrantonio, V., Amendolia, S., Gaiarsa, S., Epis, S., Genchi, C., Bandi, C.,
 985 Otranto, D., Urbanelli, S., 2013. Effects of global changes on the climatic niche of the
 986 tick *Ixodes ricinus* inferred by species distribution modelling. *Parasit. Vectors* 6, 271.
 987 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-271>

988 Roßbach, B., Kegel, P., Zier, U., Niemietz, A., Letzel, S., 2014. Protective efficacy of
 989 permethrin-treated trousers against tick infestation in forestry workers. *Ann. Agric.*
 990 *Environ. Med.* 21, 712–717. <https://doi.org/10.5604/12321966.1129920>

991 Sarangi, L.N., Tharani, N., Polapally, S., Rana, S.K., Thodangala, N., Bahekar, V.S., Prasad,
 992 A., Chandrasekhar Reddy, R.V., Surendra, K.S.N.L., Gonuguntla, H.N., Ponnanna,
 993 N.M., Sharma, G.K., 2021. Infectious bovine abortions: observations from an organized
 994 dairy herd. *Braz. J. Microbiol.* 52, 439–448. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00414-x>

995
 996 Selles, S.M.A., Kouidri, M., González, M.G., González, J., Sánchez, M., González-Coloma,
 997 A., Sanchis, J., Elhachimi, L., Olmeda, A.S., Tercero, J.M., Valcárcel, F., 2021.
 998 Acaricidal and Repellent Effects of Essential Oils against Ticks: A Review. *Pathogens*
 999 10, 1379. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111379>

1000 Semenza, J.C., Suk, J.E., 2018. Vector-borne diseases and climate change: a European
 1001 perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 365, fnx244. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx244>

1002 Skotarczak, B., 2015. Why is There Still no Human Vaccine Against Lyme Borreliosis? *Folia*
 1003 *Biol. (Praha)* 63, 159–165. https://doi.org/10.3409/fb63_3.159

1004 Sprong, H., Trentelman, J., Seemann, I., Grubhoffer, L., Rego, R.O.M., Hajdušek, O., Kopáček,
1005 P., Šíma, R., Nijhof, A.M., Anguita, J., Winter, P., Rotter, B., Havlíková, S., Klempa,
1006 B., Schetters, T.P., Hovius, J.W.R., 2014. ANTIDotE: anti-tick vaccines to prevent tick-
1007 borne diseases in Europe. *Parasit. Vectors* 7, 77. [https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-77)
1008 77

1009 Swale, D.R., Bloomquist, J.R., 2019. Is DEET a dangerous neurotoxicant? *Pest Manag. Sci.* 75,
1010 2068–2070. <https://doi.org/10.1002/ps.5476>

1011 Szczepańska, A., Kiewra, D., Guz-Regner, K., 2018. Sensitivity of *Ixodes ricinus* (L., 1758)
1012 and *Dermacentor reticulatus* (Fabr., 1794) ticks to *Bacillus thuringiensis* isolates:
1013 preliminary study. *Parasitol. Res.* 117, 3897–3902. [https://doi.org/10.1007/s00436-018-](https://doi.org/10.1007/s00436-018-6096-z)
1014 6096-z

1015 Tabb, J.S., Rapoport, E., Han, I., Lombardi, J., Green, O., 2022. An antigen-targeting assay for
1016 Lyme disease: Combining aptamers and SERS to detect the OspA protein.
1017 *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 41, 102528.
1018 <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102528>

1019 Tang, W.-D., Tang, H.-L., Peng, H.-R., Ren, R.-W., Zhao, P., Zhao, L.-J., 2023. Inhibition of
1020 tick-borne encephalitis virus in cell cultures by ribavirin. *Front. Microbiol.* 14.

1021 Thiviyanathan, V., Gorenstein, D.G., 2012. Aptamers and the Next Generation of Diagnostic
1022 Reagents. *Proteomics Clin. Appl.* 6, 563–573. <https://doi.org/10.1002/prca.201200042>

1023 Tokarz, R., Lipkin, W.I., 2020. Discovery and Surveillance of Tick-Borne Pathogens. *J. Med.*
1024 *Entomol.* 58, 1525–1535. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa269>

1025 Tokarz, R., Mishra, N., Tagliafierro, T., Sameroff, S., Caciula, A., Chauhan, L., Patel, J.,
1026 Sullivan, E., Gucwa, A., Fallon, B., Golightly, M., Molins, C., Schriefer, M., Marques,
1027 A., Briese, T., Lipkin, W.I., 2018. A multiplex serologic platform for diagnosis of tick-
1028 borne diseases. *Sci. Rep.* 8, 3158. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21349-2>

1029 Tuerk, C., Gold, L., 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA
1030 ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505–510.
1031 <https://doi.org/10.1126/science.2200121>

1032 Varghese, J., De Silva, I., Millar, D.S., 2023. Latest Advances in Arbovirus Diagnostics.
1033 *Microorganisms* 11, 1159. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051159>

1034 Vivekananda, J., Kiel, J.L., 2006. Anti-*Francisella tularensis* DNA aptamers detect tularemia
1035 antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay. *Lab.*
1036 *Invest.* 86, 610–618. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700417>

1037 Wengerter, B.C., Katakowski, J.A., Rosenberg, J.M., Park, C.G., Almo, S.C., Palliser, D., Levy,
1038 M., 2014. Aptamer-targeted antigen delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 22,
1039 1375–1387. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.51>

1040 Wilczek, C.K., Wenderlein, J., Hiereth, S., Straubinger, R.K., 2023. A Retrospective Study with
1041 a Commercial Vaccine against Lyme Borreliosis in Dogs Using Two Different
1042 Vaccination Schedules: Characterization of the Humoral Immune Response. *Vaccines*
1043 11, 43. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010043>

1044 Winkler, W.G., Baer, G.M., 1976. Rabies immunization of red foxes (*Vulpes fulva*) with
1045 vaccine in sausage baits. *Am. J. Epidemiol.* 103, 408–415.
1046 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112240>

1047 Wu, J., Zhu, Y., Xue, F., Mei, Z., Yao, L., Wang, X., Zheng, L., Liu, J., Liu, G., Peng, C., Chen,
1048 W., 2014. Recent trends in SELEX technique and its application to food safety
1049 monitoring. *Mikrochim. Acta* 181, 479–491. [https://doi.org/10.1007/s00604-013-1156-](https://doi.org/10.1007/s00604-013-1156-7)
1050 7

1051 Zakotnik, S., Knap, N., Bogovič, P., Zorec, T.M., Poljak, M., Strle, F., Avšič-Županc, T.,
1052 Korva, M., 2022. Complete Genome Sequencing of Tick-Borne Encephalitis Virus
1053 Directly from Clinical Samples: Comparison of Shotgun Metagenomic and Targeted
1054 Amplicon-Based Sequencing. *Viruses* 14, 1267. <https://doi.org/10.3390/v14061267>

1055 Zavadska, D., Anca, I., André, F., Bakir, M., Chlibek, R., Čížman, M., Ivaskeviciene, I.,
1056 Mangarov, A., Mészner, Z., Pokorn, M., Prymula, R., Richter, D., Salman, N., Šimurka,
1057 P., Tamm, E., Tešović, G., Urbancikova, I., Usonis, V., 2013. Recommendations for
1058 tick-borne encephalitis vaccination from the Central European Vaccination Awareness
1059 Group (CEVAG). *Hum. Vaccines Immunother.* 9, 362–374.
1060 <https://doi.org/10.4161/hv.22766>

1061 Zhou, J., Rossi, J., 2017. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges.
1062 *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 181–202. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199>

1063

Objectifs de la thèse

L'état de l'art a permis de présenter les enjeux de l'anaplasmose granulocytaire en santé publique et animale et d'identifier les principales questions de recherche qui restent à ce jour sans réponse. Ce manque de connaissances s'explique par les difficultés méthodologiques auxquelles est confrontée la communauté scientifique, pour l'isolement, la culture et l'étude d'*A. phagocytophilum*. Une des principales difficultés identifiées est le manque d'outils moléculaires disponibles, en particulier les anticorps monoclonaux, pour l'étude de la bactérie et de ses interactions à une échelle moléculaire et cellulaire avec les hôtes vertébrés et invertébrés. Développer de nouveaux outils d'étude est donc une réelle nécessité pour améliorer les connaissances actuelles sur *A. phagocytophilum*. Le choix des aptamères semble être judicieux, en raison de leurs nombreux avantages, présentés dans l'état de l'art. Les aptamères sont de puissants outils en infectiologie, pour la mise au point de nouvelles techniques de détection des infections, le diagnostic des maladies et pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Ils sont également facilement modifiables et peuvent donc être exploités à diverses fins : purification, marquage ou blocage d'une cible, transport de molécules... Leurs applications à *A. phagocytophilum* semblent donc a priori prometteuses.

L'objectif de cette thèse était de transposer la technologie des aptamères à l'étude d'*A. phagocytophilum*. Ce projet était un vrai défi car très peu d'études ont réussi à sélectionner des aptamères spécifiques de cibles intracellulaires et une seule étude mentionne des aptamères sélectionnés contre une bactérie intracellulaire stricte, *Rickettsia typhi* (Javaherian et al., 2009; Bruno et al., 2016). Il a tout d'abord été nécessaire de définir la chimie de la banque initiale. Notre choix s'est porté sur une banque à ADN, en raison de sa meilleure résistance aux nucléases et de son faible coût, comparé à une chimie à ARN (Ni et al., 2011). La chimie à ARN modifiée était également une possibilité mais il s'agit d'une chimie peu connue et plus complexe. Dans notre étude, deux approches ont été développées pour sélectionner des aptamères spécifiques d'*A. phagocytophilum* ou de molécules exprimées durant l'infection, à des fins de recherche ou de diagnostic.

La première approche a consisté à sélectionner des aptamères contre une suspension enrichie en *A. phagocytophilum*. Cette suspension a été obtenue après une étape de purification de la bactérie de ses cellules hôtes et contient les deux formes d'*A. phagocytophilum* (forme répliquative aussi appelée forme réticulée RC et infectieuse aussi appelée forme dense ou DC) ainsi que des molécules bactériennes et cellulaires. Cette

approche a l'avantage de permettre de sélectionner des aptamères contre une diversité de cibles, à savoir *A. phagocytophilum* ou des molécules bactériennes/cellulaires exprimées durant l'infection. Les aptamères sélectionnés pourront être utilisés pour identifier de nouvelles molécules d'intérêt en vue de développer de nouveaux moyens de dépistage de l'infection/diagnostic de la maladie et/ou de lutte. Cependant, cette approche reste très complexe et est associée à un risque élevé de sélectionner des aptamères contre des molécules cellulaires non spécifiques à l'infection (Javaherian et al., 2009). Un protocole SELEX personnalisé a donc été mis en place pour limiter ce risque. Cette approche est détaillée dans le premier chapitre de la partie expérimentale et se divise en trois sous-chapitres. Le premier correspond à la mise en place et à l'optimisation du protocole de sélection dans notre laboratoire. Le second sous-chapitre présente les résultats de sélection des aptamères et l'étude de leur affinité dans différents modèles cellulaires. Enfin, le dernier sous-chapitre présente des résultats préliminaires pour des applications potentielles et futures, en diagnostic et en thérapeutique.

L'objectif de la deuxième approche était de sélectionner des aptamères contre la protéine Asp14 recombinante. Cette méthode de sélection possède l'avantage d'être mieux documentée dans la littérature, d'être simple et rapide, comparée à la première approche. Cette protéine étant située à la surface d'*A. phagocytophilum*, des aptamères spécifiques de la bactérie pourront être obtenus. L'objectif à long terme serait de développer une méthode de capture de la bactérie, pour faciliter son enrichissement et sa culture à partir de prélèvements. Cette approche est présentée dans le deuxième chapitre de la partie expérimentale de cette thèse.

Etude expérimentale

Chapitre 1 : Sélection d'aptamères contre une suspension enrichie en *A. phagocytophilum*

I. Optimisation du protocole de sélection d'aptamères

I.A. Introduction et objectifs

Malgré son apparente simplicité du point de vue technique, le SELEX est une méthode complexe, associée à un fort taux d'échec, estimé à plus de 70% (Famulok and Mayer, 2014). Cette technique demande de l'expertise et une réflexion à chaque étape de la sélection. Le premier objectif du projet était donc d'optimiser les étapes clés du SELEX, afin d'augmenter les chances de sélectionner des aptamères contre *A. phagocytophilum* ou des molécules exprimées durant l'infection (**Figure 22**).

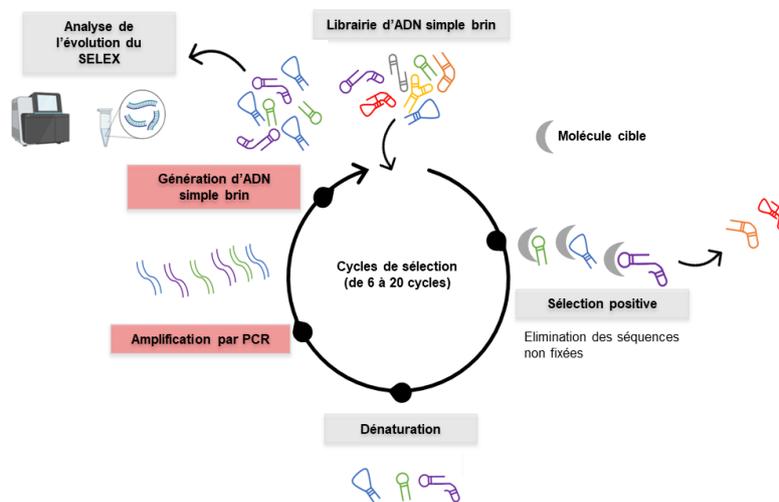


Figure 22 Les principales étapes du SELEX. Les encadrés rouges correspondent aux étapes critiques du protocole.

Comme mentionné précédemment, l'amplification par PCR est une des étapes critiques du SELEX, puisqu'elle peut entraîner la production de sous-produits (*PCR-by-products*), qui viennent parasiter la sélection par un enrichissement de séquences non spécifiques (Tolle et al., 2014). Ainsi, la première étape d'optimisation a consisté à déterminer les conditions PCR optimales pour amplifier la librairie choisie.

L'étape de génération d'ADN simple brin est également une étape critique du SELEX, dont l'impact direct sur la sélection et l'enrichissement des séquences a été démontré (Oteng et al., 2020).

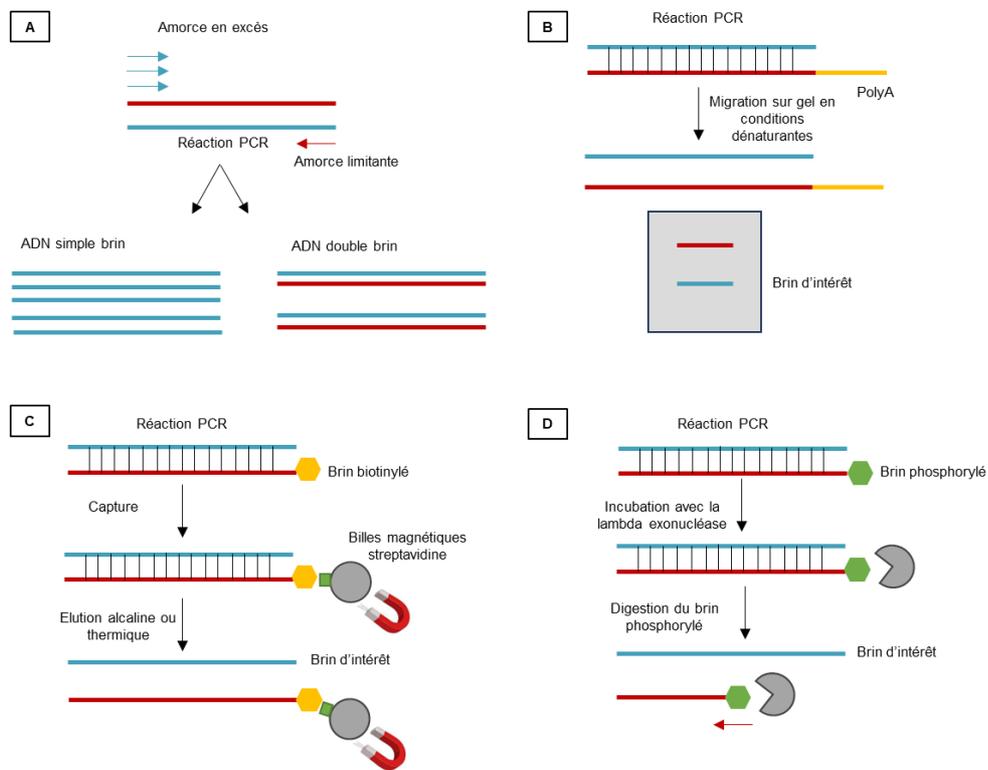


Figure 23 Principes des méthodes de génération d'ADN simple brin pour le SELEX. A: PCR asymétrique, B: Séparation des brins en conditions dénaturantes, C: Capture du brin biotinylé sur des billes magnétiques couplées à de la streptavidine, D: Digestion du brin phosphorylé par la lambda exonucléase.

Plusieurs méthodes de génération d'ADN simple brin ont été décrites, telles que la PCR asymétrique, la séparation des brins dans des conditions dénaturantes, la capture sur des billes magnétiques couplées à de la streptavidine et la digestion par la lambda exonucléase (Marimuthu et al., 2012). Leur principe est présenté dans la **Figure 23**.

- La PCR asymétrique consiste à utiliser une amorce en excès lors de l'amplification des séquences fixées à la cible (Yeoh et al., 2022). Bien que rapide et peu coûteuse, cette méthode génère également de l'ADN double brin et nécessite donc une étape de migration sur gel puis d'extraction de l'ADN simple brin. Cette étape de purification supplémentaire diminue considérablement le rendement final d'ADN simple brin (Svobodová et al., 2012). En outre, la PCR asymétrique nécessite de nombreuses optimisations pour déterminer les conditions PCR optimales, comme la concentration des amorces, le nombre de cycles d'amplification, la concentration en $MgCl_2$,... (Yeoh et al., 2022).
- La séparation des brins après migration sur gel en conditions dénaturantes est une autre méthode de génération d'ADN simple brin. Dans ce cas, l'amplification par PCR

est réalisée avec une amorce anti-sens modifiée chimiquement à son extrémité par un groupe de haut poids moléculaire (queue polyA...). Les brins de différentes tailles sont ensuite séparés après électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes. Une étape d'extraction sur gel est nécessaire pour récupérer le brin d'intérêt. Cette méthode est efficace et offre un bon rendement, estimé à 83%, mais est peu utilisée en raison du coût élevé des amorces modifiées (Marimuthu et al., 2012; Liang et al., 2015).

- La méthode de capture sur des billes magnétiques couplées à de la streptavidine est une méthode couramment utilisée qui consiste à réaliser la PCR avec une amorce anti-sens biotinylée. En raison de la très forte affinité entre la streptavidine et la biotine (K_d de l'ordre de 10^{-14} mol/L), les produits PCR sont capturés sur des billes magnétiques couplées à de la streptavidine par le biais de l'interaction avec le brin biotinylé (Marimuthu et al., 2012). Le brin d'intérêt non biotinylé est ensuite récupéré par dénaturation thermique ou alcaline, rompant les liaisons hydrogène. Cette méthode alternative possède un assez bon rendement, estimé à 57,3% et a l'avantage d'éviter l'étape d'extraction sur gel (Svobodová et al., 2012). Cependant, la dénaturation alcaline ou thermique peut dissocier la streptavidine de son support, qui constitue une nouvelle cible pour les aptamères, ce qui peut conduire à l'échec du SELEX (Paul et al., 2009). Il est donc conseillé d'ajouter une étape d'extraction au phénol-chloroforme pour éliminer la streptavidine. Une perte de rendement après extraction est attendue, mais n'a pas été documentée dans la littérature.
- Enfin, la méthode de digestion par la lambda exonucléase est une méthode plus récente. Elle repose sur l'activité enzymatique de la lambda exonucléase, capable de digérer les brins phosphorylés d'un ADN double brin avec une affinité 20 fois plus élevée que pour les brins non phosphorylés (Marimuthu et al., 2012). Les aptamères sont donc amplifiés par PCR avec une amorce anti-sens phosphorylée. Les produits PCR sont ensuite incubés avec l'enzyme, qui dégrade le brin phosphorylé. Cette méthode a montré un bon rendement, estimé à 68,7% dans des études ultérieures, mais nécessite également une étape d'extraction pour éliminer la lambda exonucléase (Avci-Adali et al., 2009; Svobodová et al., 2012).

La seconde étape d'optimisation visait donc à choisir la méthode optimale de génération d'ADN simple brin, c'est-à-dire permettant une production rapide et efficace d'ADN simple brin de qualité (sans ADN double brin) et en quantité suffisante pour poursuivre la sélection. Très peu d'articles ont fait état d'études comparatives des différentes méthodes (Avci-Adali et al., 2009; Civit et al., 2012; Svobodová et al., 2012). En outre, ces études n'ont pas été réalisées avec des quantités d'ADN double brin initiales équivalentes et le rendement final obtenu après

extraction n'a pas été documenté. Nous avons donc fait face à un manque de données, rendant difficile le choix de la méthode à appliquer pour la future sélection.

Nous avons donc entrepris une étude comparative rigoureuse des deux méthodes les plus avantageuses, d'une part la méthode de capture sur billes magnétiques couplées à de la streptavidine et d'autre part la méthode de digestion par la lambda exonucléase. L'objectif était 1) d'optimiser le protocole de ces méthodes pour augmenter leur rendement respectif, 2) de définir la méthode de quantification d'ADN simple brin optimale, en comparant trois techniques (mesure de l'absorbance à 260 nm au Nanodrop®, mesure par fluorimétrie avec le Qubit® et quantification sur gel avec le logiciel ImageJ), 3) de comparer les méthodes de génération d'ADN simple brin en étudiant leur rendement avant et après précipitation à l'éthanol ou extraction au phénol-chloroforme.

Ces travaux d'optimisation ont fait l'objet d'un article dans le journal MDPI, dans la section *Methods and Protocols*.

Article: Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Brosseau, N.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Lagrée, A.-C.; Deshuillers, P.L. **Optimized Lambda Exonuclease Digestion or Purification Using Streptavidin-Coated Beads: Which One Is Best for Successful DNA Aptamer Selection?** *Methods Protoc.* 2022, 5, 89. <https://doi.org/10.3390/mps5060089>.

Article

Optimized Lambda Exonuclease Digestion or Purification Using Streptavidin-Coated Beads: Which One Is Best for Successful DNA Aptamer Selection?

Lisa Lucie Le Dortz, Clotilde Rouxel , Quentin Leroy, Noah Brosseau, Henri-Jean Boulouis, Nadia Haddad *, Anne-Claire Lagrée  and Pierre Lucien Deshuillers 

Laboratoire de Santé Animale, Anses, INRAe, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, F-94700 Maisons-Alfort, France

* Correspondence: nadia.haddad@vet-alfort.fr

Abstract: The high failure rate of the in vitro aptamer selection process by SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) limits the production of these innovative oligonucleotides and, consequently, limits their potential applications. The generation of single-stranded DNA (ssDNA) is a critical step of SELEX, directly affecting the enrichment and the selection of potential binding sequences. The main goal of this study was to confirm the best method for generating ssDNA by comparing the purification of ssDNA, using streptavidin-coated beads, and lambda exonuclease digestion, and by improving ssDNA recovery through protocol improvements. In addition, three techniques for quantifying the ssDNA generated (Qubit vs. Nanodrop™ vs. gel quantification) were compared, and these demonstrated the accuracy of the gel-based quantification method. Lambda exonuclease digestion was found to be more efficient for ssDNA recovery than purification using streptavidin-coated beads, both quantitatively and qualitatively. In conclusion, this work provides a detailed and rigorous protocol for generating ssDNA, improving the chances of a successful aptamer selection process.

Keywords: aptamer; ssDNA generation; SELEX; streptavidin-coated beads; lambda exonuclease digestion



Citation: Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Brosseau, N.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Lagrée, A.-C.; Deshuillers, P.L. Optimized Lambda Exonuclease Digestion or Purification Using Streptavidin-Coated Beads: Which One Is Best for Successful DNA Aptamer Selection? *Methods Protoc.* **2022**, *5*, 89. <https://doi.org/10.3390/mps5060089>

Academic Editor: Philip Hublitz

Received: 7 July 2022

Accepted: 26 October 2022

Published: 29 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In the 20th century, nucleic acids were mainly studied for their role as carriers of genetic information. In 1990, Ellington and Szostak published a pioneering article related to the binding specificity of RNA to ligands and to a method for their synthesis and isolation [1]. They proposed the term “aptamers” to designate them. In the same year, Tuerk and Gold described an in vitro selection method for the production of aptamers with high affinity, which they called “SELEX” for Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment [2]. SELEX is still the reference method used today. Aptamers are defined as short single-stranded DNA or RNA sequences (generally <100 nucleotides) able to bind to a range of targets with high affinity and specificity, such as proteins [3], lipids, small inorganic molecules, co-factors, cells [4], bacteria [5], and viruses [6], through various interactions, for example, hydrogen bonds, electrostatic and Van der Waals (VdW) interactions [7]. Aptamers are also known as chemical antibodies with significant advantages in terms of stability, synthesis, target diversity and non-toxicity [8]. Functioning as ligands with agonistic or antagonistic properties, they have been developed in many research fields, such as oncology [9], virology, and microbiology, mainly for therapeutic [10,11], diagnostic, and imaging purposes [12,13]. Despite the growing interest in the scientific community for aptamers over the past 25 years, only one aptamer drug was approved by the FDA in 2004 for the treatment of neovascular, age-related, macular degeneration [11]. This limited development can be partly explained by the complex and time-consuming selection process

of aptamers. SELEX is an iterative selection process involving several steps, including: incubation of ssDNA/RNA random library with a target, PCR amplification of the binding sequences, and generation of ssDNA/RNA. Despite its apparent simplicity, SELEX has a high failure rate, possibly as high as 70% [14]. The generation of ssDNA is a critical step, requiring a fast and efficient method to produce enough ssDNA that are free of impurities, for the enrichment of potentially binding sequences [15].

Several ssDNA generation methods have been reported for SELEX, including asymmetric PCR, strand separation under denaturing conditions, magnetic separation with streptavidin-coated beads and lambda exonuclease digestion [16,17]. Asymmetric PCR is often considered a robust and low-cost method [16,18]. However, this method is time-consuming as it is strongly recommended to adjust the PCR conditions for each round of SELEX. Several optimizations can be performed, such as the modification of primers concentration and/or ratio, number of PCR cycles, annealing temperature, dNTP, and MgCl₂ concentrations [19,20]. In addition, asymmetric PCR produces ssDNA, as well as dsDNA [18,21]. As a result, asymmetric PCR is often combined with a gel purification step or other ssDNA generation methods [22]. Strand separation under denaturing conditions is based on the differential migration of two strands of different sizes, and the desired band is then purified from the gel. Although very efficient, this method is time-consuming and requires the use of more expensive primers with chemical modifications [16]. Purification of ssDNA using streptavidin-coated beads and lambda exonuclease digestion are frequently used in the literature as they produce less or no dsDNA, and do not require a gel purification step. However, the removal of streptavidin or lambda exonuclease by phenol-chloroform extraction is advised, potentially significantly decreasing the amount of recovered ssDNA [23,24].

Very few studies have compared the lambda exonuclease digestion and purification of ssDNA using streptavidin-coated beads for ssDNA generation [25,26]. Those comparison studies used standard ssDNA generation protocols, without investigating and applying optimizations proposed by other studies to improve the final ssDNA yield [21,27]. In addition, only one study has reported the yields obtained after digestion by lambda exonuclease and phenol-chloroform extraction, and no yield data are available for streptavidin-coated beads [24]. This lack of information makes the choice of the ssDNA generation method difficult for aptamer selection. To overcome this gap in knowledge, the quality and quantity of the ssDNA generated for purification using streptavidin-coated beads and lambda exonuclease digestion were compared, before and after ethanol precipitation or phenol-chloroform extraction. The main goal of this paper is to provide a rigorous comparison of ssDNA generation methods by addressing the following aspects: protocol optimizations, study of the impact of ethanol precipitation and phenol-chloroform extraction on ssDNA recovery, and the choice of an accurate ssDNA quantification technique, by comparing three techniques: absorbance at 260 nm (Nanodrop™), fluorimetry (Qubit), and image analysis following gel migration (ImageJ).

2. Materials and Methods

2.1. ssDNA Library and Primers

A ssDNA library was purchased from Eurogentec, after polyacrylamide gel electrophoresis purification (PAGE). This library was made up of approximately 6×10^{14} different ssDNA sequences, consisting of 40 random nucleotides flanked by 20 nucleotide-long constant sequences for primer hybridization (5'-CTCCTCTGACTGTAACCACG40NGCAT-AGGTAGTCCAGAAGCC-3' [28]). The library was amplified by PCR using a common forward primer (5'-CTCCTCTGACTGTAACCACG-3'; Eurofins). A biotinylated reverse primer (5'-Biotin GGCTTCTGG ACTACCTATGC-3'; Eurofins), purified by HPLC, was used for purification using streptavidin-coated beads, while a phosphorylated reverse primer (5'-Phosphate GGCTTCTGGACTACCTATGC-3'; Eurogentec), purified by HPLC with unprotected phosphate groups, was needed for lambda exonuclease digestion. The concentration of the primers and the library was determined by the supplier, by measuring

the absorbance at 260 nm and calculated from the molar extinction coefficient of the DNA. Oligonucleotides were stored at a concentration of 100 μM at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2. Amplification of ssDNA Library

2.2.1. Optimization of PCR Conditions

An annealing temperature gradient (from $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$) and a number of amplification cycles (6, 8, 10, 12, 15, 20 and 25 cycles) were tested independently to define the optimal PCR conditions. The ssDNA library was denatured at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min and 2.5 μL of 1 μM library (10^{12} sequences) was used as a starting template. For each amplification, PCR reactions were conducted in a volume of 25 μL , including GoTaq Flexi Buffer 1 \times (Promega, Madison, WI, USA), 200 μM of dNTPs (Invitrogen, Waltham, MA, USA), 2.5 mM of MgCl_2 (Promega), 1.25 units of GoTaq G2 Hot Start Polymerase (Promega), and 0.5 μM of forward and modified reverse primers. The amplification program consisted of an initial DNA denaturation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min, followed by 6, 8, 10, 12, 15, 20 and 25 cycles of denaturation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s, annealing at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s and elongation at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s. A final extension was performed at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 60 s. PCR products (10 μL) with 2 μL of loading buffer (Invitrogen) were run on a 4% (*w/v*) agarose gel stained with GelRed[®] (Biotium, Fremont, CA, USA) in TAE 1 \times buffer (Bioscience, Allentown, PA, USA) at 90 V for 2 h. A 50 bp size marker (TrackIt[™]50 bp DNA Ladder, Invitrogen) was used for size determination.

2.2.2. Large-Scale PCR Amplification

The optimal reaction conditions were applied to perform large-scale PCR amplification with 40 PCR tubes, each containing 50 μL (for a final volume of 2 mL). PCR products were purified using a NucleoSpin Gel and a PCR Clean Up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions, with the following modifications: elution was performed twice after 5 min of incubation with 15 μL of elution buffer, previously heated to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ten μL of PCR products were diluted to 1/5th and deposited on a 4% (*w/v*) agarose gel. The dsDNA concentration was determined after gel electrophoresis with a quantitative size marker (Quick-Load Purple Low Molecular Weight DNA Ladder, NEB) and electrophoretic analysis of the band intensities using the ImageJ program.

2.3. Optimization of Capture on Streptavidin-Coated Magnetic Beads

Dynabeads M-270 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used as previously described [29], with the amount of beads recommended (20 mg of beads for 2 μg of dsDNA). Before their use, the beads were washed three times with a 2 \times Binding and Washing buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA and 2 M NaCl). The biotinylated PCR products (2 μg) were incubated with pre-washed beads for 30 min at 850 rpm. To improve recovery of the non-biotinylated sense DNA strand, alkaline and thermal denaturation were compared. For alkaline denaturation, beads were incubated twice with 50 μL of a freshly prepared 200 mM NaOH solution for 3 min. The eluted ssDNA was neutralized with TE buffer (pH = 7.5) and HCl (150 mM). For thermal denaturation, the bead suspension was heated to $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min at 850 rpm [29]. For both methods, the eluted products were revealed on a 4% (*w/v*) agarose gel stained with GelRed[®] and a 50 bp marker. For further optimization, the number of beads was increased (50 mg for 2 μg of dsDNA) and a range of NaOH concentrations was tested (20, 75, 150 and 300 mM) for alkaline elution.

2.4. Optimization of Lambda Exonuclease Digestion

For the lambda exonuclease digestion of the anti-sense DNA strand, digestion time is the most critical step [21]. Hence, several incubation times (5, 15, 30, 45, and 60 min) were tested. For each time point, 2 μg of phosphorylated dsDNA were incubated with 5 μL of reaction buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 1 μL of lambda exonuclease (10 U/ μL , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), filled to a final volume of 50 μL with ultrapure water. The enzymatic mix was incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ at 650 rpm. The enzyme was then heat-inactivated ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min). The products were

revealed on a 4% (*w/v*) agarose gel stained with GelRed[®], using a 50 bp size marker for size determination. The incubation time giving the highest dsDNA digestion was chosen for the method comparison.

2.5. Comparison of ssDNA Generation Methods

To compare ssDNA generation with streptavidin-coated magnetic beads or lambda exonuclease digestion, optimal conditions were set as follows: 2 µg of dsDNA template, 50 mg of beads and alkaline denaturation with 150 mM NaOH for the first method, and 30 min of digestion at 37 °C for the second method.

2.5.1. Purification of ssDNA

For each method, ssDNA was purified by ethanol precipitation (*n* = 5 samples) or phenol-chloroform extraction (*n* = 5 samples). For ethanol precipitation, a linear polyacrylamide co-precipitant (5 µL, Invitrogen), 1/10th of the sample volume of 3 M sodium acetate (pH = 5.2), supplemented with 2.5 volumes of absolute ethanol at −20 °C, were added to the eluted products and incubated overnight at −20 °C. After centrifugation for 20 min at 20,000× *g* at 4 °C, the pellets were washed with 650 µL of 95% ethanol [30]. Centrifugation was performed for 15 min at 20,000× *g* at 4 °C and the final pellet was dissolved in 50 µL of ultrapure water after drying for 15 min. For phenol-chloroform extraction, one volume of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was added to the eluted products. After centrifugation for 5 min at 16,000× *g* at 4 °C, the aqueous upper phase was recovered for each sample and precipitated with ethanol, following the protocol described above. The final products were revealed on a 4% (*w/v*) agarose gel stained with GelRed[®].

2.5.2. ssDNA Quantification Techniques

The ssDNA generated was quantified by three techniques: fluorimetry with Qubit, absorbance at 260 nm with Nanodrop[™], and gel-based quantification with ImageJ software. Two Qubit measurement kits for Qubit Fluorometer 4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used, according to the manufacturer's instructions. The amount of ssDNA in the samples was determined by subtracting the amount of dsDNA, measured by Qubit dsDNA HS (which only detects dsDNA), from the amount of total DNA, measured by Qubit ssDNA (which detects both dsDNA and ssDNA). ssDNA was quantified spectrophotometrically (Nanodrop One, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 260 nm. For gel-based quantification, the final products (10 µL), mixed with 2 µL of loading buffer 6×, were loaded into a 4% (*w/v*) agarose gel stained with GelRed[®], along with the initial library at various concentrations (4, 8, 12, 16 and 20 ng/µL). Electrophoresis was run in TAE 1× buffer for 2 h at 90 V. A calibration curve was designed with the intensity of the library bands plotted against library concentrations. ssDNA concentrations of eluted or digested samples were calculated from band intensities. To validate the concentration range and method, a sample with a known ssDNA concentration from the library (26 ng/µL) was used as a control (Figure S1).

2.5.3. ssDNA Recovery

The method yields were determined using the three ssDNA quantification techniques, before and after the purification step with the following formula: % ssDNA recovery = $\left(\frac{\text{amount of ssDNA obtained before or after extraction step}}{\text{total amount of ssDNA before purification:1 } \mu\text{g}} \right) \times 100$. The initial amount of dsDNA used for both methods is 2 µg, corresponding to 1 µg of ssDNA.

2.5.4. Statistical Analysis

All the variables were expressed as mean ± standard deviation (SD). A Student's *t*-test was performed to compare the ssDNA amounts recovered by the different methods. The results were considered statistically significant for *p* < 0.05.

3. Results

3.1. Optimization of PCR Conditions

In order to optimize the binding of primers with the library, annealing temperatures ranging from 50 °C to 70 °C were tested (Figure 1). Between 50 °C and 64 °C, a band estimated by ImageJ software at 95 bp was observed. Above 64 °C, a lower band estimated at 87 bp (ImageJ software) became predominant (Figure 1a). The presence of these two bands at unexpected sizes is explained by the important number of cycles (20 cycles) applied for the temperature range. The choice of annealing temperature was based on the yield of dsDNA. An annealing temperature of 58 °C was considered optimal and used further for PCR, as it allowed a maximum amount of dsDNA (Figure 1b) to be obtained. To set the optimal number of amplification cycles, the library was amplified for 6, 8, 10, 12, 15, 20 and 25 cycles at 58 °C (Figure 2). An upper band (95 bp) appeared as early as 8 cycles of amplification and became the most prominent band from the 15th cycle. From the 10th amplification cycle, the gel revealed a band at 40 bp (ssDNA), corresponding to non-amplified sequences due to the limitation of PCR reagents. Six amplification cycles were considered optimal based on the production of dsDNA at the expected size (80 bp). In order to validate these results, a new temperature range was performed from 40 °C to 70 °C with the optimal number of cycles (6 cycles, Figure 3). At low (<51 °C) and high temperature (>61 °C), a decrease of PCR yield was observed. The amplification of 0.1 μM of library at 58 °C after 6 cycles allowed the production of large quantities of dsDNA at the expected size, confirming that these PCR conditions were optimal.

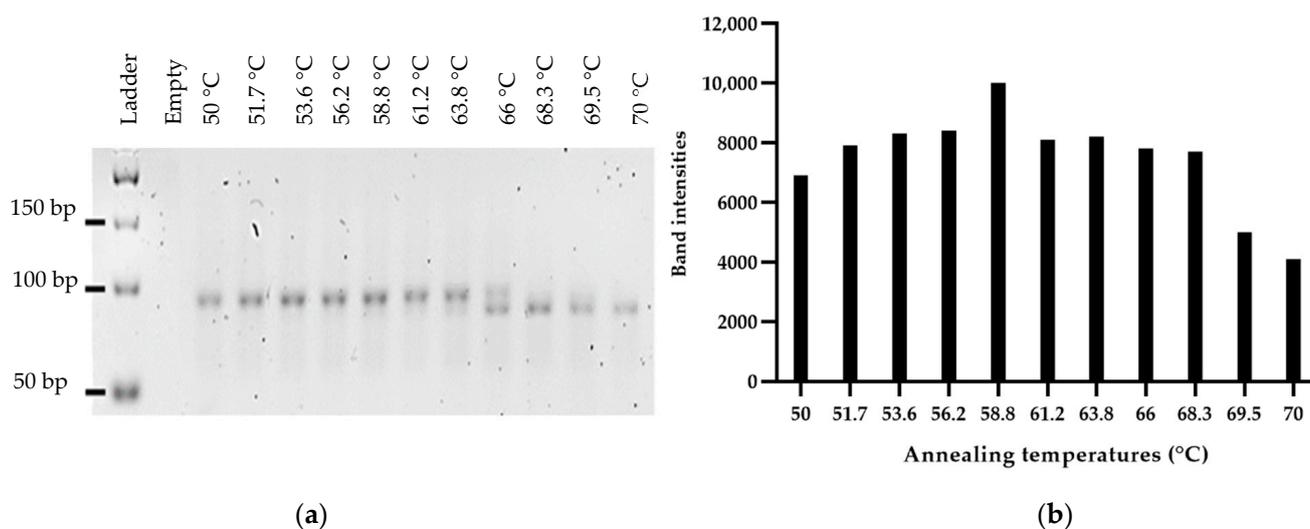


Figure 1. (a): Agarose gel electrophoresis (4% agarose, 90 V, 2 h in TAE 1× GelRed®) of the PCR products of the aptamer library with 20 cycles of amplification and annealing temperatures ranging from 50 °C to 70 °C. The legends above the gel correspond to the tested annealing temperatures. (b): Representation of the band intensities (ImageJ) as a function of the tested annealing temperature. Band intensities represent the amount of dsDNA produced.

3.2. Optimization of Capture on Streptavidin-Coated Magnetic Beads

To improve ssDNA recovery, alkaline and thermal denaturation were compared (Figure 4). With alkaline elution (200 mM NaOH), ssDNA and dsDNA were eluted in the same proportions. With thermal denaturation, dsDNA and high molecular weight structures, corresponding to a complex of streptavidin and biotinylated DNA, were recovered. Contrary to alkaline denaturation, ssDNA was not eluted by thermal denaturation in our study (Figure 4a). In view of these initial results, thermal elution was abandoned, and optimization of alkaline elution was pursued. Specifically, an increased quantity of beads (from 20 mg to 50 mg for 2 μg of DNA) and several NaOH concentrations (from 20 to 300 mM) were tested in order to improve the capture of PCR products and the recovery of

ssDNA, respectively. With an excess number of beads relative to dsDNA (50 mg for 2 μ g of dsDNA), the capture of the PCR product was very efficient since no band corresponding to the PCR product could be detected after the capture and washing steps (data not shown). For all NaOH concentrations, the predominantly eluted DNA was ssDNA. However, for NaOH concentrations above 200 mM, dsDNA contamination was observed (Figure 4b), indicating the dissociation of the biotin-streptavidin bond. Comparison of the intensity of the bands with ImageJ software showed that 150 mM of NaOH allowed for a better ssDNA recovery compared to 20 or 75 mM NaOH (Figure 4b). This concentration was therefore considered optimal and was used for the following experiments.

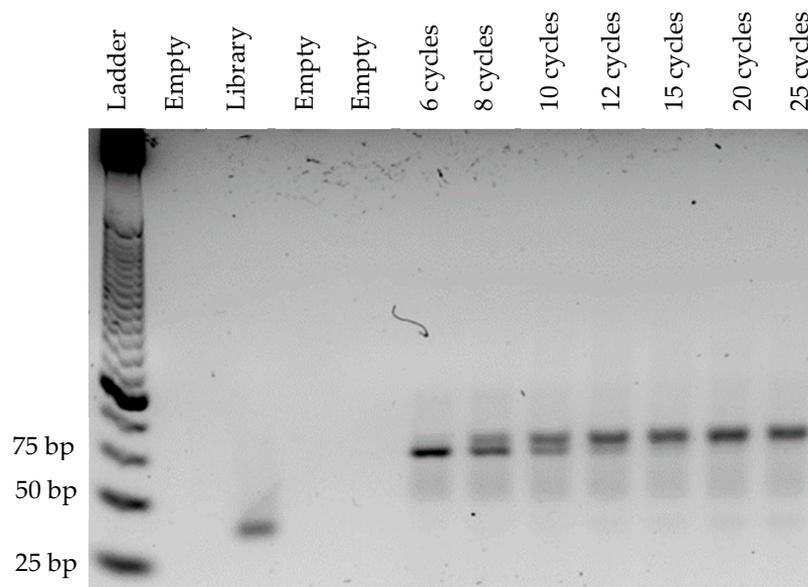


Figure 2. Agarose gel electrophoresis (4% agarose, 90 V, 2 h in TAE 1 \times GelRed[®]) of the PCR products, after variable numbers of amplification cycles (from 6 to 25 cycles) performed with an annealing temperature of 58 $^{\circ}$ C. The legends above the gel correspond to the number of amplification cycles.

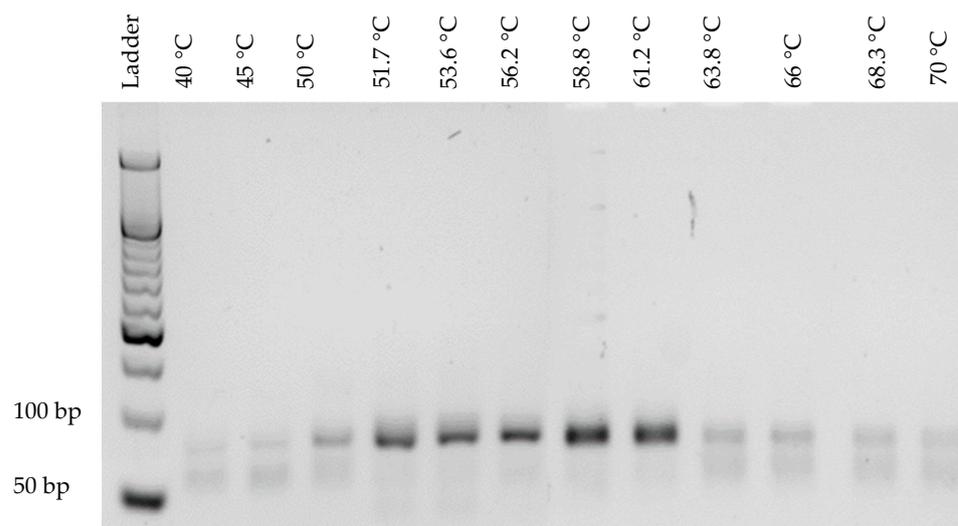


Figure 3. Agarose gel electrophoresis (4% agarose, 90 V, 2 h in TAE 1 \times GelRed[®]) of the PCR products of the aptamer library with 6 cycles of amplification and annealing temperatures ranging from 40 $^{\circ}$ C to 70 $^{\circ}$ C. The legends above the gel correspond to the tested annealing temperatures.

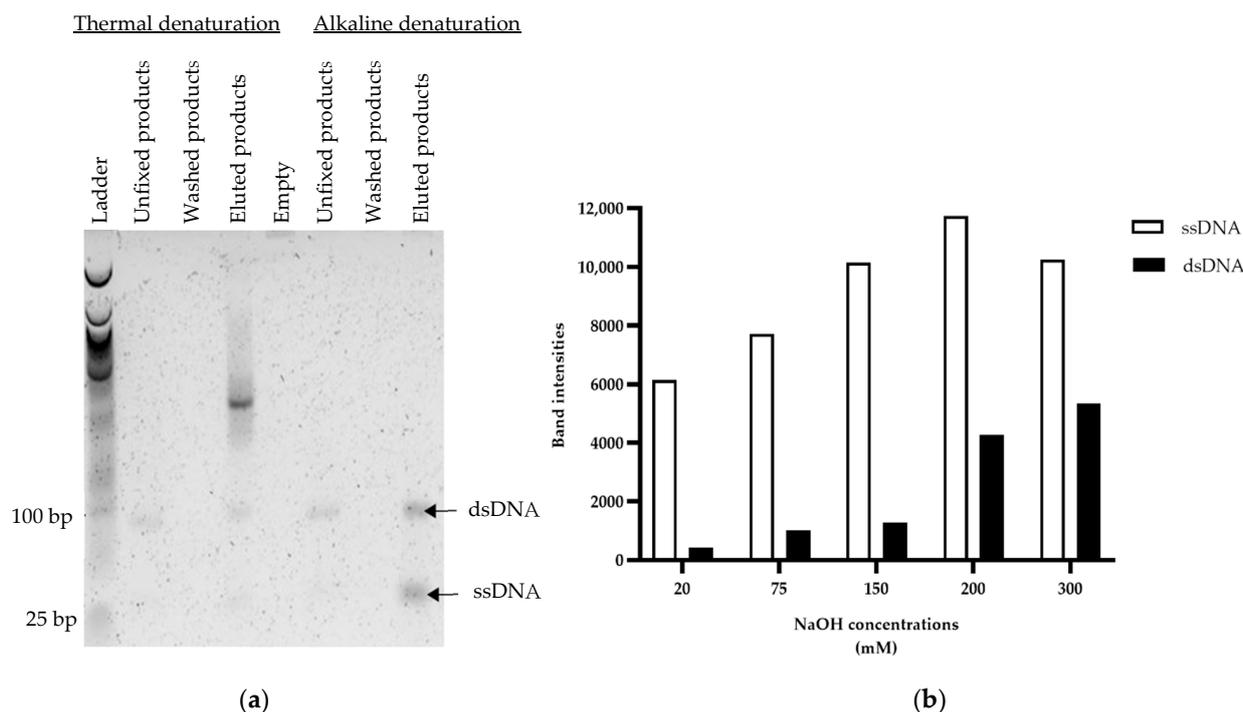


Figure 4. (a): Agarose gel electrophoresis (4% agarose, 90 V, 2 h in TAE 1× GelRed[®]) of eluted products following two elution methods (alkaline denaturation with 200 mM NaOH and thermal denaturation) with 20 mg of streptavidin-coated magnetic beads. (b): Representation of the band intensities (ImageJ), according to different NaOH concentrations tested (20, 75, 150, 200 and 300 mM NaOH) with 50 mg of beads. Band intensities represent the amount of ssDNA or dsDNA produced.

3.3. Optimization of Lambda Exonuclease Digestion

Lambda exonuclease digestion of the phosphorylated strand was confirmed by a time-course analysis after 5, 15, 30, 45 and 60 min of incubation (Figure 5). After 5 min of incubation with lambda exonuclease, two bands corresponding to ssDNA and dsDNA were revealed, indicating partial digestion. From 15 min, only ssDNA was detected, and the intensity of the bands remained unchanged between 15 and 60 min of digestion (ImageJ). In line with the literature, a 30 min incubation time was selected to ensure an optimal digestion of the phosphorylated strand [21].

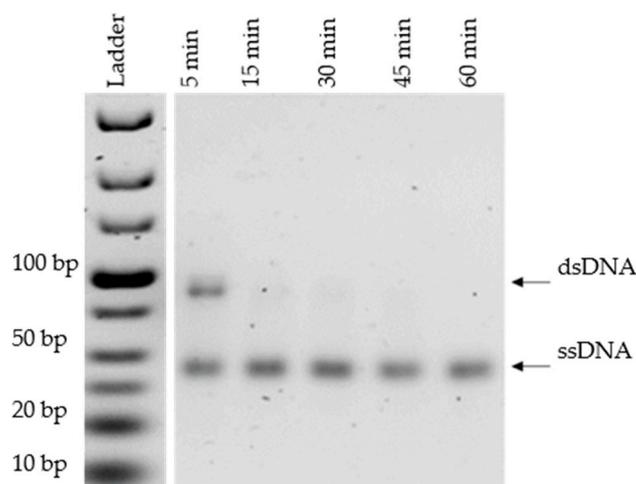


Figure 5. Agarose gel electrophoresis (4% agarose, 90 V, 2 h in TAE 1× GelRed[®]) of the final products after 5 to 60 min of incubation with lambda exonuclease. Products were revealed on a 4% agarose gel at 90 V for 2 h (TAE 1×, GelRed[®]).

3.4. Comparison of ssDNA Quantification Techniques

Three different quantification techniques, including fluorimetry (Qubit), absorbance at 260 nm (Nanodrop™), and gel quantification, were compared. Pre-extraction yields cannot be determined by Nanodrop or Qubit as the presence of streptavidin or lambda exonuclease and salts interfere considerably with the assays. For this reason, only the post-extraction yields were compared. Under these conditions, the yields determined by Qubit, Nanodrop™ and gel-based quantification were significantly different according to Student's *t*-test ($p < 0.05$) (Tables S1 and S2, Figures 6 and 7). Regardless of the method used to generate ssDNA, the Nanodrop technique provided the highest values, followed by the gel quantification method, then by the Qubit method. The use of a sample with a known ssDNA concentration (26 ng/μL) demonstrated the accuracy of the gel-based quantification method; therefore, this method was chosen for the comparison of ssDNA generation yields (Figure S1).

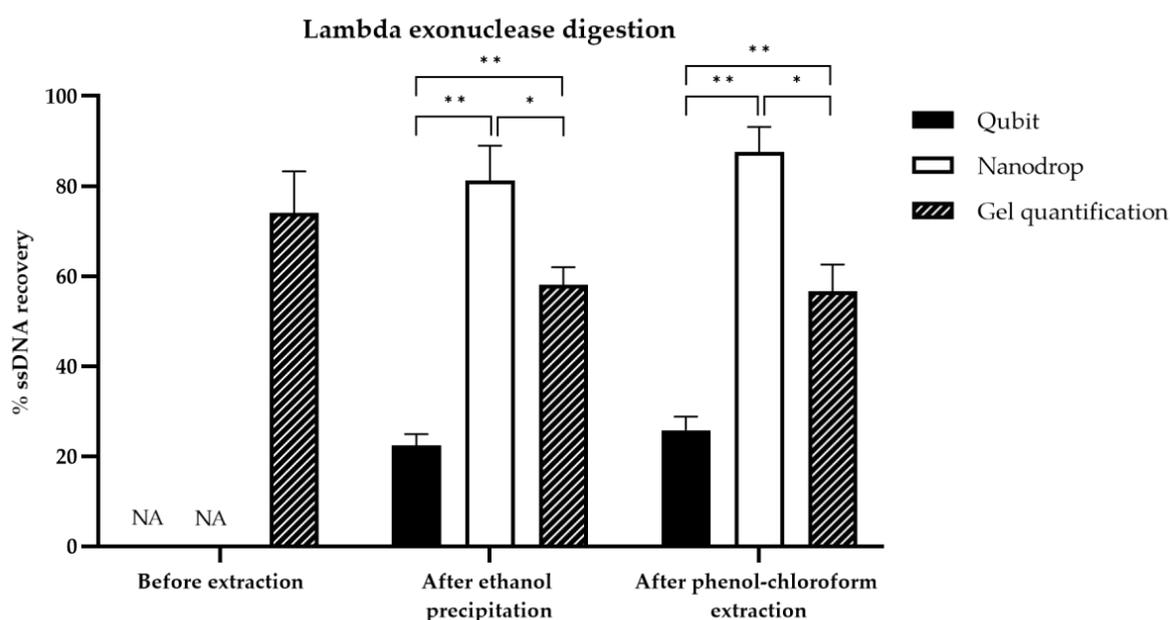


Figure 6. Histogram of ssDNA recovery quantified by Qubit, Nanodrop or gel quantification for lambda exonuclease digestion before and after two types of purification. The three ssDNA quantification techniques were compared in a peer comparison by Student's statistical test. Asterisks represent significant differences according to Student's *t* test (*: threshold of 0.01 or **: threshold of 0.001).

3.5. Comparison of ssDNA Generation Methods

3.5.1. Quantitative Evaluation

The recovery rates of ssDNA quantified by gel electrophoresis after purification using streptavidin-coated beads or lambda exonuclease digestion were compared (Figure 8, Tables S1 and S2). Before ethanol or phenol-chloroform extraction, the recovery rate of ssDNA was estimated at $44\% \pm 5.8$ and $74\% \pm 9.3$, using streptavidin-coated beads and lambda exonuclease digestion, respectively. After ethanol precipitation, the yield of ssDNA decreased significantly to $34.3\% \pm 6.4$ ($n = 5$) for the streptavidin-coated beads, and to $58.1\% \pm 3.9$ ($n = 5$) for lambda exonuclease digestion. These yields were not significantly different after phenol-chloroform extraction with $39.7\% \pm 1.8$ ($n = 5$) for the streptavidin-coated beads, and $56.6\% \pm 6.0$ ($n = 5$) for lambda exonuclease digestion. Overall, lambda exonuclease digestion, with or without extraction steps, resulted in a 20–30% higher ssDNA recovery than purification using streptavidin-coated beads.

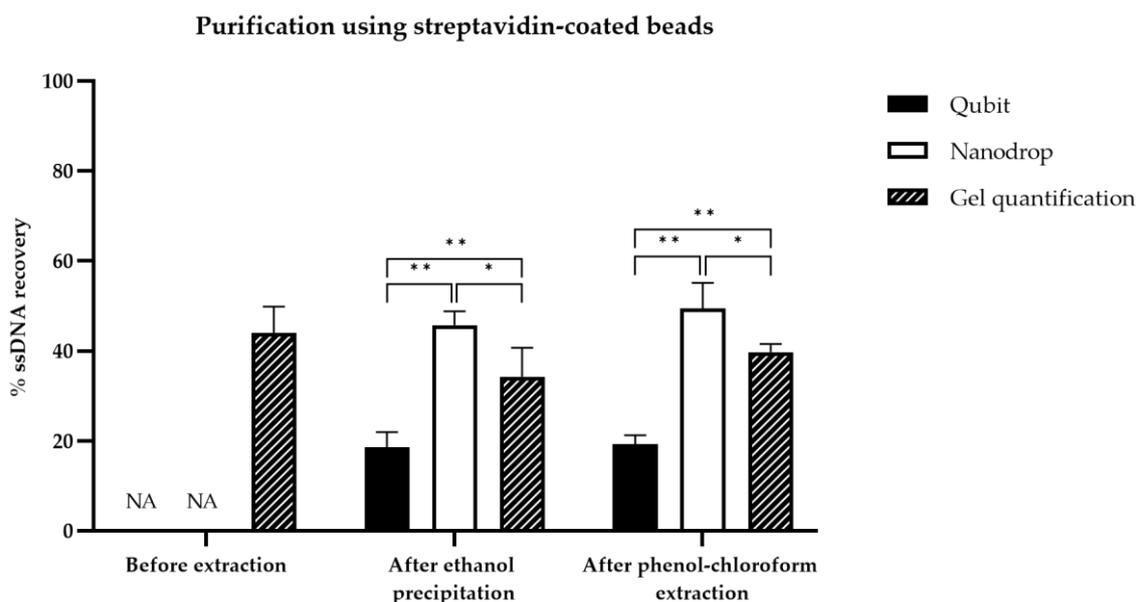


Figure 7. Histogram of ssDNA recovery quantified by Qubit, Nanodrop or gel quantification for purification of ssDNA using streptavidin-coated beads before and after two types of purification. The three ssDNA quantification techniques were compared in a peer comparison by Student's statistical test. Asterisks represent significant differences according to Student's *t* test (*: threshold of 0.01 or **: threshold of 0.001).

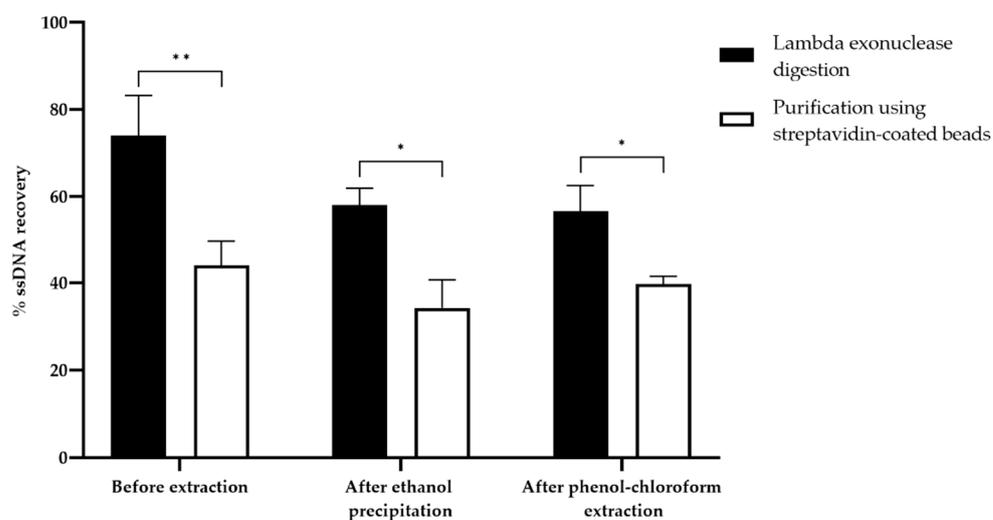


Figure 8. Histogram of ssDNA recovery quantified by gel electrophoresis for the two-ssDNA generation methods before and after two types of purification. Asterisks represent significant differences according to Student's *t*-test (*: threshold of 0.01 or **: threshold of 0.001).

3.5.2. Qualitative Evaluation

In order to purify and concentrate the final product, two purification methods were compared (phenol-chloroform extraction vs. ethanol precipitation) to aid in the choice of the purification method. The results showed no significant difference between the two methods (Student's *t*-test, $p > 0.05$). Phenol-chloroform extraction did not significantly change the recovery rate compared to simple ethanol precipitation (Figure 8, Table S1). In addition, it allowed for the elimination of lambda exonuclease and streptavidin, still present after ssDNA generation.

After the purification of ssDNA using streptavidin-coated beads, undesired dsDNA was observed (Figure 4a) and only ssDNA was detected after 30 min of digestion by lambda

exonuclease (Figure 5). Lambda exonuclease allowed the generation of ssDNA free of impurities with less dsDNA contamination compared to the streptavidin-coated beads.

4. Discussion

A starting SELEX library consists of numerous sequences, composed of variable regions with more or less complexity, making aptamer amplification difficult and problematic. The annealing temperature was chosen based on the maximum dsDNA yield as it is reported to have little influence on the presence of non-specific products [18]. We observed a maximum amount of dsDNA at 58 °C (Figure 1b), which was the theoretical annealing temperature of the primers, as determined *in silico*. For the following experiments, the annealing temperature was set at 58 °C. The presence of the two bands at unexpected sizes was attributed to the unusually high number of PCR cycles for aptamer amplification (20 cycles). Then, we optimized the number of PCR cycles, as recommended in the literature, to avoid PCR by-products, as they increase with the numbers of PCR cycles [31,32]. Importantly, sequences can hybridize to each other by complementarity, with their variable region or their constant regions forming larger size products, which become more and more prevalent as the number of amplification cycle increases [19]. Starting with a concentration of 0.1 µM of library, in our conditions, the optimal number of amplification cycles corresponded to 6 cycles, as it produces dsDNA at the expected size, which is consistent with the literature (Figure 2) [24]. Using a temperature range from 40 °C to 70 °C, we finally confirmed the optimal annealing temperature for 6 cycles of amplification (Figure 3). We observed a decrease of PCR yields at low and high annealing temperatures. At a low annealing temperature, primers can hybridize non-specifically to the complementary sequences present in the variable regions, reducing the efficiency of the PCR [19]. High annealing temperature weakens the hybridization of primers at their binding sites, also decreasing the PCR efficiency [18]. The annealing temperature can be set to 58 °C for aptamer selection with our library. However, the number of amplification cycles, depending on the number of aptamers selected, needs to be optimized at each selection round.

Before comparing the two ssDNA generation methods, their respective protocols were optimized to improve ssDNA recovery. For streptavidin-coated beads, three improvements were tested. First, the recovery of the non-biotinylated sense strand by alkaline treatments gave better yields and the lowest streptavidin contamination, compared to the heat treatment, which may rupture the non-covalent bonds of streptavidin as previously documented [27] (Figure 4a). Second, an increase of 25 to 50 mg of beads improved the capture of 2 µg of PCR products and downstream ssDNA recovery. Third, dsDNA contamination was observed at a high NaOH concentration (200 mM), due to the breakdown of hydrophobic, VdW or hydrogen bonds or the surface loop between biotinylated DNA and streptavidin (Figure 4b) [33]. As sensitivity of the beads to the alkaline treatment depends on their three-dimensional structure and their steric surface, a range of NaOH concentration needs to be tested for each type of bead [33]. In view of our results, a NaOH concentration of 150 mM is strongly recommended for users of Dynabeads M-270. The most critical step for lambda exonuclease digestion is the incubation time. Based on a time-course analysis, we obtained an optimal digestion at 30 min for 1 µg of phosphorylated strand by 10 unit/µL of lambda exonuclease (Figure 5). Previous studies report digestion of the other strand when incubation time is increased, a phenomenon which was not observed in our case [24]. Lambda exonuclease works in several buffers, but not with the same efficiency [34]. Exploring the efficiency of lambda exonuclease digestion in PCR mix would be worthwhile and may help saving precious time.

After the optimization of ssDNA generation, the amount of ssDNA recovered with each method was compared and quantified using three ssDNA quantification techniques (Figures 6 and 7). Most comparison studies quantify ssDNA recovery by absorbance at 260 nm or by gel electrophoresis. However, to the best of our knowledge, no study has compared the three ssDNA quantification techniques described herein. The gel-based quantification technique has many advantages. This technique allows the visualization of

dsDNA and ssDNA, when using GelRed[®] as an intercalating agent. GelRed[®] is less efficient to detect ssDNA than dsDNA and the recognition is dependent on the type of sequences [35]. However, GelRed[®] is much more sensitive than ethidium bromide for both dsDNA and ssDNA detection, as ethidium bromide detects ssDNA very weakly [35]. According to our results, this intercalating agent could be strongly recommended to quantify ssDNA with gel electrophoresis. In addition, the gel-based quantification avoids interference by salt or organic solvents for ssDNA quantification, as only ssDNA band intensity is analyzed by ImageJ software. Qubit is often considered a reliable and repeatable measurement method for dsDNA quantification [36]. However, the specificity and sensitivity of Qubit for ssDNA detection has not yet been demonstrated. In our study, an underestimation of ssDNA concentration was observed compared to the gel quantification method, which can be explained by the presence of phenol/ethanol residues in the sample after precipitation, already observed after Trizol extraction [36]. Based on these results, the Qubit technique appears to be unreliable for the quantification of ssDNA. The overestimation of ssDNA concentrations observed with Nanodrop[™] is not surprising, particularly in cases of low concentration samples (<20 ng/ μ L) and contamination by organic solvents. Ethanol shows UV absorbance with peak values at 230–240 nm, while phenol contamination shows a clear shift of the 260 nm peak in the spectrum towards 270 nm [37]. In addition, the Nanodrop[™] cannot distinguish dsDNA from ssDNA, oligonucleotides and free nucleotides. Thus, gel electrophoresis is demonstrated to be the most accurate ssDNA quantification method among the three methods tested. Another accurate method for ssDNA quantification is called Enzyme-linked oligonucleotide assay (ELONA) [25,26]. However, compared to the gel quantification, it is very expensive and time-consuming, and therefore not adequate for routine, rapid quantification.

The yields quantified by gel electrophoresis after streptavidin-coated bead vs. lambda exonuclease generation were compared (Figure 8). The yields of streptavidin-coated beads, quantified before purification (44%), were lower than those observed in the study of Civit et al., (62%) [26]. This may be explained by the use of different magnetic beads (Dynabeads MyOne C1), with a better binding capacity. However, from the available publications, these beads seem less frequently used for SELEX. After ethanol precipitation (34.3%), the ssDNA recovery was lower than in previously published data: Liang et al. obtained a yield over 80%, quantified by Nanodrop, but this method overestimates ssDNA concentrations [38]. Our study provides new data on the yield of streptavidin-coated beads after phenol-chloroform extraction (39.7%), as no published study mentions it. In the case of lambda exonuclease digestion, the ssDNA recovery rate obtained before purification (74%) is higher than the rates reported in the literature (65% in the study of Civit et al.) [26]. These positive results can be attributed to the optimization of PCR conditions and the determination of an optimal lambda digestion time. After phenol-chloroform extraction, the yield (56.6%) was higher than that obtained by Citartan et al., (39.19% by absorbance measurement at 260 nm) [24]. Regardless of the assay technique, lambda exonuclease digestion provided higher yields compared to the purification of ssDNA using streptavidin-coated beads, which is consistent with the study of Avci-Adali et al. [21].

Finally, the two ssDNA generation methods were evaluated qualitatively. First, the purification of the final products is essential to produce ssDNA free of impurities. Indeed, salts from buffers can alter the binding conditions of SELEX [21]. The maximum loss observed was 15% for ethanol precipitation and 17% for phenol-chloroform extraction, while a 30% loss of ssDNA is described in the literature [21]. Our improved results can be explained by the optimization of the protocol (washing step with 95% ethanol and the addition of a co-precipitant). It has been clearly demonstrated that streptavidin contamination has a negative impact on aptamer selection. Streptavidin can be responsible for cell aggregation, disrupting the SELEX process, especially when testing the binding of aptamer pools by flow cytometry [23]. Streptavidin can also constitute a good target for aptamers and may be responsible for the enrichment of non-specific and undesired sequences, leading to SELEX failure [15], a problem not encountered with lambda exonuclease. The effect of

lambda exonuclease contamination on the selection process has not yet been demonstrated and should be further investigated. Within this method, no significant reduction in yield was observed between ethanol precipitation and phenol-chloroform extraction. Therefore, phenol-chloroform extraction should be strongly considered after ssDNA generation.

Moreover, the ssDNA generation method should not generate dsDNA contamination, as specific and highly affine ssDNA sequences may be lost [16]. According to the literature, it is not uncommon to observe contamination by dsDNA due to NaOH treatment after purification of ssDNA using streptavidin-coated beads, despite optimization [23,26], contrary to lambda exonuclease digestion. The generation of ssDNA by lambda exonuclease digestion is therefore advantageous both in terms of the yield of ssDNA generated and purity.

5. Conclusions

This work provides useful information in addition to previous studies [24,25], by comparing the two most commonly used ssDNA generation methods. The impact of ethanol precipitation or phenol-chloroform extraction on ssDNA yields were studied through robust data on optimized conditions. The yields were documented by three ssDNA quantification techniques, demonstrating the accuracy of the gel technique for small quantities of ssDNA measurement. Based on the in-depth comparison proposed in this study, lambda exonuclease digestion gave better results than the purification of ssDNA using streptavidin-coated magnetic beads in terms of quantity and quality of ssDNA. Lambda exonuclease digestion also gives additional advantages over streptavidin-coated beads, in terms of time (1 h process for lambda exonuclease digestion vs. 3 h for purification of ssDNA using streptavidin-coated beads), cost (83 euros for 100 uses for lambda exonuclease digestion vs. 1500 euros for 100 uses for purification of ssDNA using streptavidin-coated beads) and ease of use [29,39]. In addition, lambda exonuclease digestion has already demonstrated efficient selection of many aptamers against various targets, providing faster and more specific sequence enrichment than purification of ssDNA using streptavidin-coated beads [26,40–42]. All these advantages make the lambda exonuclease digestion method a promising and efficient alternative for ssDNA generation. Its application within a SELEX process could facilitate the selection of functional aptamers and consequently the development of their applications in fundamental research, as well as for diagnostic or therapeutic purposes. Our results could be extended to wider molecular and biotechnology applications requiring a ssDNA generation step, including pyrosequencing, single-stranded conformation polymorphism analysis, and DNA chips [43].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/mps5060089/s1>, Figure S1: Quantification of the control (library), using gel-based quantification. (a): Agarose gel analysis of the concentration range of the library. Products were revealed on a 4% agarose gel at 90 V for 2 h (TAE 1×, GelRed®). (b): Confirmation of the control concentration using the correlation curve between band intensities (ImageJ software) and the concentration range. Table S1: Average ssDNA concentration (ng/μL) obtained after purification using streptavidin-coated beads or lambda exonuclease digestion, before or after ethanol precipitation/phenol-chloroform extraction. Table S2: Average ssDNA recovery (%) obtained after purification using streptavidin-coated beads or lambda exonuclease digestion, before or after ethanol precipitation/phenol-chloroform extraction.

Author Contributions: Conceptualization, L.L.L.D. and C.R.; methodology, L.L.L.D., Q.L. and N.B.; software, L.L.L.D.; validation, L.L.L.D., C.R., Q.L., H.-J.B., N.B., N.H., A.-C.L. and P.L.D.; formal analysis, L.L.L.D., C.R., H.-J.B., N.H., A.-C.L. and P.L.D.; investigation, L.L.L.D. and C.R.; resources, H.-J.B., N.H., A.-C.L. and P.L.D.; data curation, L.L.L.D. and Q.L.; writing—original draft preparation, L.L.L.D. and N.H.; writing—review and editing, L.L.L.D., C.R., Q.L., H.-J.B., N.B., N.H., A.-C.L. and P.L.D.; visualization, L.L.L.D., C.R., Q.L., H.-J.B., N.B., N.H., A.-C.L. and P.L.D.; supervision, H.-J.B., N.H., A.-C.L. and P.L.D.; project administration, H.-J.B., N.H., A.-C.L. and P.L.D.; funding acquisition, H.-J.B., N.H., A.-C.L. and P.L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially funded by the Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA) and was supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES). L.L.L.D was funded by ABIES from AgroParisTech. UMR BIPAR is supported by the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant No. ANR-10-LABEX-62-IBEID).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Frédéric Ducongé for stimulating discussions and support.

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

References

1. Ellington, A.D.; Szostak, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–822. [[CrossRef](#)]
2. Tuerk, C.; Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **1990**, *249*, 505–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wang, T.; Yin, W.; AlShamaileh, H.; Zhang, Y.; Tran, P.H.-L.; Nguyen, T.N.-G.; Li, Y.; Chen, K.; Sun, M.; Hou, Y.; et al. A Detailed Protein-SELEX Protocol Allowing Visual Assessments of Individual Steps for a High Success Rate. *Hum. Gene Ther. Methods* **2019**, *30*, 1–16. [[CrossRef](#)]
4. Ohuchi, S. Cell-SELEX Technology. *BioResearch Open Access* **2012**, *1*, 265–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Marton, S.; Cleto, F.; Krieger, M.A.; Cardoso, J. Isolation of an Aptamer that Binds Specifically to *E. coli*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Bala, J.; Chinnapaiyan, S.; Dutta, R.K.; Unwalla, H. Aptamers in HIV research diagnosis and therapy. *RNA Biol.* **2018**, *15*, 327–337. [[CrossRef](#)]
7. Röthlisberger, P.; Hollenstein, M. Aptamer chemistry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *134*, 3–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Zhang, Y.; Lai, B.S.; Juhas, M. Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules* **2019**, *24*, 941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kordasht, H.K.; Hasanzadeh, M. Aptamer based recognition of cancer cells: Recent progress and challenges in bioanalysis. *Talanta* **2020**, *220*, 121436. [[CrossRef](#)]
10. Zhou, J.; Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 181–202. [[CrossRef](#)]
11. Nimjee, S.M.; White, R.R.; Becker, R.C.; Sullenger, B.A. Aptamers as Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *57*, 61–79. [[CrossRef](#)]
12. Park, K.S. Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102*, 179–188. [[CrossRef](#)]
13. Dougherty, C.A.; Cai, W.; Hong, H. Applications of Aptamers in Targeted Imaging: State of the Art. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 1138–1152. [[CrossRef](#)]
14. Famulok, M.; Mayer, G. Aptamers and SELEX in Chemistry & Biology. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1055–1058.
15. Oteng, E.K.; Gu, W.; McKeague, M. High-efficiency enrichment enables identification of aptamers to circulating Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 9706. [[CrossRef](#)]
16. Citartan, M.; Tang, T.-H.; Tominaga, J.; Tan, S.-C.; Gopinath, S.C.B. Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. *Analyst* **2012**, *137*, 1307–1315.
17. Komarova, N.; Kuznetsov, A. Inside the Black Box: What Makes SELEX Better? *Molecules* **2019**, *24*, 3598. [[CrossRef](#)]
18. Yeoh, T.S.; Anna, A.; Tang, T.-H.; Citartan, M. Development of an optimization pipeline of asymmetric PCR towards the generation of DNA aptamers: A guide for beginners. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *38*, 31. [[CrossRef](#)]
19. Tabar zad, M.; Kazemi, B.; Vahidi, H.; Aboofazeli, R.; Shahhosseini, S.; Nafissi-Varcheh, N. Challenges to Design and Develop of DNA Aptamers for Protein Targets. I. Optimization of Asymmetric PCR for Generation of a Single Stranded DNA Library. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **2014**, *13*, 133–141.
20. Heiat, M.; Ranjbar, R.; Latifi, A.M.; Rasaee, M.J.; Farnoosh, G. Essential strategies to optimize asymmetric PCR conditions as a reliable method to generate large amount of ssDNA aptamers. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2017**, *64*, 541–548. [[CrossRef](#)]
21. Avci-Adali, M.; Paul, A.; Wilhelm, N.; Ziemer, G.; Wendel, H.P. Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation. *Molecules* **2009**, *15*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zhang, Y.; Xu, H.; Zhou, H.; Wu, F.; Su, Y.; Liang, Y.; Zhou, D. Indirect purification method provides high yield and quality ssDNA sublibrary for potential aptamer selection. *Anal. Biochem.* **2015**, *476*, 84–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Paul, A.; Avci-Adali, M.; Ziemer, G.; Wendel, H.P. Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX. *Oligonucleotides* **2019**, *19*, 243–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Citartan, M.; Tang, T.-H.; Tan, S.C.; Gopinath, S.C.B. Conditions optimized for the preparation of single-stranded DNA (ssDNA) employing lambda exonuclease digestion in generating DNA aptamer. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27*, 1167–1173. [CrossRef]
25. Svobodová, M.; Pinto, A.; Nadal, P.; O’ Sullivan, C.K. Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 835–842. [CrossRef]
26. Civit, L.; Fragoso, A.; O’Sullivan, C.K. Evaluation of techniques for generation of single-stranded DNA for quantitative detection. *Anal. Biochem.* **2012**, *431*, 132–138. [CrossRef]
27. Kilili, G.K.; Tilton, L.; Karbiwnyk, C.M. NaOH concentration and streptavidin bead type are key factors for optimal DNA aptamer strand separation and isolation. *BioTechniques* **2016**, *61*, 114–116. [CrossRef]
28. Iqbal, A.; Liu, J.; Dixon, B.; Zargar, B.; Sattar, S.A. Development and application of DNA-aptamer-coupled magnetic beads and aptasensors for the detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in drinking and recreational water resources. *Can. J. Microbiol.* **2019**, *65*, 851–857. [CrossRef]
29. Dynabeads Streptavidin FAQ—FR. Available online: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/product-brand/dynal/streptavidin-coupled-dynabeads/dynabeads-streptavidin.html> (accessed on 23 October 2022).
30. Moore, D.; Dowhan, D. Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2002**, *59*, 1–2. [CrossRef]
31. Tolle, F.; Wilke, J.; Wengel, J.; Mayer, G. By-Product Formation in Repetitive PCR Amplification of DNA Libraries during SELEX. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e114693. [CrossRef]
32. Tominaga, J.; Saini, R.; Hoe, C.-H.; Tang, T.-H.; Tan, S.-C.; Citartan, M.; Gopinath, S.C.B. Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production. *Songklanakarin J. Sci. Technol. SJST* **2012**, *34*, 125–131.
33. Wilson, R. Preparation of single-stranded DNA from PCR products with streptavidin magnetic beads. *Nucleic Acid Ther.* **2011**, *21*, 437–440. [CrossRef] [PubMed]
34. Lambda Exonuclease NEB. Available online: https://www.neb.com/products/m0262-lambda-exonuclease#Product%20Information_Product%20Notes (accessed on 23 October 2022).
35. Sapia, R.J.; Campbell, C.; Reed, A.J.; Tsvetkov, V.B.; Gerasimova, Y.V. Interaction of GelRed™ with single-stranded DNA oligonucleotides: Preferential binding to thymine-rich sequences. *Dye. Pigment.* **2021**, *188*, 109209. [CrossRef]
36. Nakayama, Y.; Yamaguchi, H.; Einaga, N.; Esumi, M. Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150528. [CrossRef] [PubMed]
37. Koetsier, G.; Cantor, E. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers NEB 2019. Available online: <https://www.science.smith.edu/cmbs/wp-content/uploads/sites/36/2020/01/A-Practical-Guide-to-Analyzing-Nucleic-Acid-Concentration-and-Purity-with-Microvolume-Spectrophotometers.pdf> (accessed on 7 July 2022).
38. Liang, C.; Li, D.; Zhang, G.; Li, H.; Shao, N.; Liang, Z.; Zhang, L.; Lu, A.; Zhang, G. Comparison of the methods for generating single-stranded DNA in SELEX. *Analyst* **2015**, *140*, 3439–3444. [CrossRef]
39. Lambda Exonuclease (10 U/μL). Available online: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EN0561> (accessed on 23 October 2022).
40. Nosaz, Z.; Rasoulinejad, S.; Mousavi Gargari, S.L. Development of a DNA aptamer to detect *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* through cell SELEX. *Iran. J. Vet. Res.* **2020**, *21*, 294–300.
41. Bitaraf, F.S.; Rasooli, I.; Mousavi Gargari, S.L. DNA aptamers for the detection of *Haemophilus influenzae* type b by cell SELEX. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *35*, 503–510. [CrossRef]
42. Bibby, D.F.; Gill, A.C.; Kirby, L.; Farquhar, C.F.; Bruce, M.E.; Garson, J.A. Application of a novel in vitro selection technique to isolate and characterise high affinity DNA aptamers binding mammalian prion proteins. *J. Virol. Methods* **2018**, *151*, 107–115. [CrossRef]
43. Veneziano, R.; Shepherd, T.R.; Ratanalert, S.; Bellou, L.; Tao, C.; Bathe, M. In vitro synthesis of gene-length single-stranded DNA. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6548. [CrossRef]

I.B. Discussion et conclusion

La librairie choisie se compose d'une fenêtre aléatoire de 40 nucléotides et de régions constantes de 20 nucléotides. La première étape a consisté à définir les conditions optimales de PCR pour assurer son amplification. Pour cela, une gamme de températures (de 50°C à 70°C) et une gamme de nombre de cycles d'amplification (de 6 à 25 cycles) ont été testées. Une température d'hybridation de 58°C a permis la production d'une quantité maximale d'ADN double brin à la taille attendue (80 nucléotides). A une concentration de 0,1 μM de librairie initiale, le nombre optimal de cycles pour l'amplification a été défini à 6 cycles. Au-delà de 6 cycles d'amplification, des produits PCR non spécifiques, de taille supérieure à 80 nucléotides, ont été mis en évidence. Ces produits PCR peuvent s'expliquer par l'hybridation des séquences d'aptamère entre elles, par complémentarité au niveau de la région constante ou de la région aléatoire (Tolle et al., 2014). Au fur et à mesure des cycles d'amplification, ces produits PCR s'accumulent. Lors du SELEX, ces produits non spécifiques peuvent donc dominer le pool final d'ADN simple brin, conduisant à un enrichissement de séquences non spécifiques et donc à l'échec du SELEX. Cette étude a confirmé l'intérêt d'optimiser la température d'hybridation et le nombre de cycles d'amplification, pour obtenir des produits PCR à la taille attendue et en quantité suffisante. Ces produits PCR obtenus ont ensuite été convertis en ADN simple brin, selon les deux méthodes que nous souhaitons comparer.

Les protocoles des méthodes de capture sur billes magnétiques couplées à de la streptavidine et de digestion par la lambda exonucléase ont été optimisés, afin d'améliorer leur rendement. Pour la méthode de capture sur billes magnétiques couplées à de la streptavidine, trois optimisations majeures ont été proposées. Premièrement, l'augmentation de la quantité de billes de streptavidine (25 à 50 mg pour 2 μg de produit PCR) a permis d'améliorer la capture de l'ADN double brin. Deuxièmement, l'élution du brin d'intérêt non biotinylé par dénaturation alcaline (traitement NaOH) est à privilégier puisqu'elle évite une contamination par la streptavidine, par rapport à une dénaturation thermique (Kilili et al., 2016). Enfin, une contamination d'ADN double brin a été observée pour des concentrations en NaOH supérieures à 200 mM, en raison de la rupture de la liaison entre la streptavidine et l'ADN double brin biotinylé (Wilson, 2011). Une concentration de 150 mM de NaOH a donc été recommandée pour les utilisateurs de Dynabeads M-270TM. Pour la méthode de digestion par la lambda exonucléase, un temps de digestion de 30 minutes avec l'enzyme (10 U/ μL) a permis une digestion optimale du brin phosphorylé.

Afin de proposer une méthode de quantification d'ADN simple brin fiable et utilisable en routine au laboratoire, trois techniques de quantification ont été comparées. Ainsi, les rendements des

deux méthodes de génération d'ADN simple brin ont été déterminés par mesure de l'absorbance à 260 nm (Nanodrop®), par fluorimétrie (Qubit®) ou par quantification de l'intensité des bandes d'ADN simple brin, après électrophorèse sur gel d'agarose (logiciel ImageJ). La présence de sels et/ ou de solvants organiques a fortement impacté les concentrations mesurées au Nanodrop® ou au Qubit®. Cet impact n'a pas été observé avec la méthode de quantification sur gel, puisque seule l'intensité de la bande correspondant à l'ADN simple brin a été quantifiée. Cette méthode de quantification s'est donc avérée fiable et avantageuse, comparée aux deux autres techniques.

Enfin, les méthodes de génération d'ADN simple brin ont été comparées quantitativement et qualitativement. Les critères étudiés étaient la qualité de l'ADN simple brin généré et les rendements d'ADN simple brin obtenus après les étapes de purification. L'étude qualitative a démontré la supériorité de la méthode de digestion par la lambda exonucléase. Une contamination par l'ADN double brin a été mise en évidence après la capture sur billes magnétiques couplées à de la streptavidine. Cette contamination est à éviter puisqu'elle peut entraîner la perte de séquences d'ADN simple brin potentiellement affines pour la cible (Marimuthu et al., 2012). La méthode de digestion par la lambda exonucléase a fourni un rendement supérieur à celui de la capture sur billes magnétiques couplées à de la streptavidine, avant ou après purification à l'éthanol ou extraction au phénol-chloroforme. Le rendement d'ADN simple brin final obtenu après extraction au phénol-chloroforme était de 56,6% pour la méthode de digestion par la lambda exonucléase, contre 39,7% pour la méthode de capture sur billes magnétiques couplées à de la streptavidine. Cette extraction est fortement conseillée afin d'éviter toute contamination du produit élué par la streptavidine ou la lambda exonucléase, qui sont des cibles potentielles pour les aptamères pour l'étape de SELEX suivante (Paul et al., 2009).

Pour conclure, cette étude a fourni une comparaison rigoureuse et approfondie des deux méthodes de génération d'ADN simple brin les plus utilisées et d'apporter des informations, qui manquaient dans la littérature. La supériorité de la méthode de digestion par la lambda exonucléase a été démontrée qualitativement et quantitativement. Ce travail a permis de choisir la méthode optimale de génération d'ADN simple brin, de mettre en place un protocole optimisé du SELEX au sein du laboratoire. Cette étude peut également servir aux autres utilisateurs du SELEX, pour la mise en place des étapes essentielles mais souvent négligées, qui conditionnent directement le succès de la sélection.

Suite à ce travail d'optimisation, les conditions suivantes ont été choisies pour notre SELEX réalisé contre une suspension enrichie en *A. phagocytophilum*. La température d'hybridation de la librairie a été fixée à 58°C. Le nombre de cycles d'amplification a été optimisé à chaque tour de sélection, lors d'une PCR préparatoire pour éviter l'amplification de produits PCR non spécifiques. La méthode de digestion par la lambda exonucléase a été choisie pour générer l'ADN simple brin, suivie d'une étape d'extraction au phénol-chloroforme. A la fin de chaque tour de sélection, la concentration finale d'ADN simple brin a été quantifiée sur gel, pour assurer une mesure précise et pour poursuivre vers un nouveau tour de sélection.

II. Sélection d'aptamères contre une suspension enrichie en *A. phagocytophilum*

II.A. Introduction et objectifs

L'objectif était ensuite de sélectionner des aptamères contre *A. phagocytophilum* ou des molécules exprimées durant l'infection. Dans la littérature, une seule étude mentionne la sélection d'aptamères contre une bactérie intracellulaire stricte, *Rickettsia typhi* (Bruno et al., 2016). Ces aptamères étaient également capables de reconnaître d'autres espèces des genres *Rickettsia* et *Orientia* et de la famille des *Rickettsiaceae*. *A. phagocytophilum* appartenant au même ordre que celui de la famille des *Rickettsiaceae*, ces aptamères ont été testés, dans une étude préliminaire, sur des cellules HL-60 infectées par la souche NY18 d'*A. phagocytophilum* (HL-60 NY18) et sur un lysat de cellules infectées. Aucun marquage n'a été observé (données non présentées). Par conséquent, ces aptamères n'étaient pas utilisables pour *A. phagocytophilum*. Tout d'abord, un travail de réflexion a été mené pour définir le modèle d'étude, c'est-à-dire la souche d'*A. phagocytophilum* et le type cellulaire à utiliser. *A. phagocytophilum* étant une bactérie intracellulaire stricte, une étape de purification à partir de cellules infectées a été nécessaire pour obtenir une suspension bactérienne enrichie. Pour choisir la méthode de purification optimale, trois méthodes de lyse cellulaire ont été comparées (lyse par passages répétés dans une aiguille, lyse mécanique par l'homogénéiseur de Dounce ou par l'utilisation de poudre de carbure de silicium). Après avoir défini la cible et la méthode de purification optimale, le SELEX a pu débuter et des stratégies ont été mises en place afin d'augmenter les chances de sélectionner des aptamères contre *A. phagocytophilum* ou des molécules associées à l'infection. L'évolution de la sélection a été suivie par deux techniques : par PCR quantitative et par analyse NGS (*Next-Generation Sequencing*), grâce à la mise en place d'une collaboration avec la plateforme MIRCen du CEA. Suite aux résultats de l'analyse NGS, les candidats aptamères les plus prometteurs ont été choisis afin d'étudier leur affinité par mesure de leur K_d par cytométrie en flux. Enfin, leurs cibles ont été localisées par microscopie confocale sur différents modèles d'infection.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article de recherche prochainement soumis dans le journal *Scientific Reports*.

Article : Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Ducongé, F.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Deshuillers, P.L; Lagrée, A.-C. **Aptamer selection against cell extracts containing the zoonotic obligate intracellular bacterium, *Anaplasma phagocytophilum*.**

1 **Aptamer selection against cell extracts containing the zoonotic**
2 **obligate intracellular bacterium, *Anaplasma phagocytophilum***

3 **Lisa Lucie Le Dortz¹, Clotilde Rouxel¹, Quentin Leroy¹, Frédéric Ducongé², Henri-Jean**
4 **Boulouis¹, Nadia Haddad¹, Pierre Lucien Deshuillers¹, Anne-Claire Lagrée¹**

5 ¹ Anses, INRAe, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, Laboratory of Animal
6 Health, Maisons-Alfort, F-94700, France

7 ²CEA, Fundamental Research Division (DRF), Institute of Biology François Jacob, Molecular
8 Imaging Research Center, CNRS UMR9199, Paris-Saclay University, 92265 Fontenay-aux-
9 Roses, France

10 *** Correspondence:**

11 Nadia Haddad

12 nadia.haddad@vet-alfort.fr

14 **Keywords:** *Anaplasma phagocytophilum*, aptamers, SELEX, binding, infected cells

15 **Abstract**

16 *A. phagocytophilum* is a zoonotic and tick-borne bacterium, threatening human and animal
17 health. Many questions persist, especially in Europe, concerning the variability of strains, the
18 epidemiological cycles and the mechanisms governing the interactions with its different hosts.
19 These gaps can be explained by the difficulty to cultivate and study *A. phagocytophilum*
20 because of its strict intracellular location, its short life span in samples and the lack of specific
21 tools, in particular monoclonal antibodies, currently unavailable. The objective of our study
22 was to develop DNA aptamers against *A. phagocytophilum*, or molecules expressed during the
23 infection, as new study and/or capture tools. Selecting aptamers was a major challenge due to
24 the strict intracellular location of the bacterium. To meet this challenge, we set up a customized
25 selection protocol against an enriched suspension of *A. phagocytophilum* NY18 strain,
26 cultivated in HL-60 cells. The implementation of SELEX allowed the selection of three
27 aptamers, characterized by a rapid and specific enrichment, and by a high affinity for HL-60
28 cells infected with *A. phagocytophilum* NY18 strain. Interestingly, the targets of these three
29 aptamers are most likely proteins expressed at different times of infection. Furthermore, our
30 results strongly suggest that two of these aptamers recognize specific targets of the vertebrate
31 infection model, while the third aptamer recognizes a protein common to the vertebrate and
32 invertebrate infection models. The selected aptamers could contribute to increase our
33 understanding of the interactions between *A. phagocytophilum* and its different hosts, as well
34 as permit the development of new diagnostic, therapeutic or drug delivery appliances.

35 1 Introduction

36

37 *Anaplasma phagocytophilum* is a strict intracellular bacterium, mainly transmitted by hard ticks
38 of the *Ixodes* genus (Dugat et al., 2015). This bacterium is responsible for granulocytic
39 anaplasmosis and has major economic and clinical impacts for both human and animal health.
40 Human granulocytic anaplasmosis (HGA) is an emerging zoonosis, described throughout North
41 America, Asia and Europe (Matei et al., 2019). In the USA, HGA constitutes a public health
42 issue, with a steadily increasing incidence: 1,761 human cases were reported in 2010, while
43 over 5,600 cases were reported in 2019 (CDC, 2022). In this country, 36 % of patients require
44 hospitalization and the estimated lethality rate is less than 1 % (Dumler, 2012). The number of
45 human cases is probably underestimated since the main clinical manifestations are most
46 commonly mild with a flu-like syndrome: hyperthermia, malaise, myalgia and migraine (Matei
47 et al., 2019). A minority of patients present arthralgia, gastrointestinal, respiratory or
48 neurological symptoms. On the contrary, in Europe, the incidence of HGA remains low,
49 estimated at around 300 cases between 2004 and 2019, and clinical signs are generally less
50 severe, with no reported deaths to date (Matei et al., 2019). In Europe still, *A. phagocytophilum*
51 is considered the most widespread tick-borne pathogen in animals and is responsible for
52 granulocytic anaplasmosis in domestic ruminants (sheep, cattle, etc.) while currently, very few
53 cases of granulocytic anaplasmosis in domestic ruminants have been reported in the USA
54 (Dumler, 2012; Eleftheriou et al., 2022). The most common clinical signs associated with *A.*
55 *phagocytophilum* infection in ruminants are hyperthermia, agalactia, anorexia, abortion,
56 respiratory distress, lameness. *A. phagocytophilum* is therefore considered to contribute to
57 important economic losses in cattle and sheep industry (Atif, 2015). *A. phagocytophilum* is
58 thought to be maintained among mostly or exclusively asymptomatic wild reservoirs, such as
59 rodents or wild ruminants in the USA (Rar et al., 2021). In Europe, the epidemiological cycles
60 of this multi-host agent are poorly understood, the reservoirs remain unknown and targeted
61 health management measures are therefore difficult to implement (Dugat et al., 2015).

62 *In vivo*, *A. phagocytophilum* infects mainly neutrophils, and has also been detected in
63 eosinophils and monocytes, as well as in endothelial cells (Rikihisa, 2011). The bacterium
64 resides within compact inclusions (micro-colonies or *morulae*) in cytoplasmic vacuoles derived
65 from the host cell. Two bacterial morphotypes exist in mammalian and tick cells: a larger
66 reticulate replicative form (RC) and a smaller dense core form (DC) corresponding to the
67 infectious form (Troese and Carlyon, 2009). To invade cells and ensure its survival, *A.*

68 *phagocytophilum* modulates diverse molecular pathways within the host cell, which are
69 responsible for remodeling the cytoskeleton, manipulating the cellular immune response,
70 hijacking metabolic pathways and delaying apoptosis to its benefit (Rikihisa, 2011; Alberdi et
71 al., 2016). However, the mechanisms of host/pathogen interactions, remain largely to be
72 explored, limiting the development of new therapeutic/screening/diagnostic strategies.

73 These gaps in knowledge can be explained by the difficulty to isolate and cultivate *A.*
74 *phagocytophilum*, because of its strict intracellular location and its very short survival in blood
75 samples (neutrophils), but also because very few permissive cells are available for *in vitro*
76 culture. Only one vertebrate model (HL-60 cells) is permissive to human *A. phagocytophilum*
77 strains, while tick cell models can be used to culture all types of strains (from ruminants,
78 humans, rodents and other wildlife and domestic animals) (Crosby et al., 2022). Currently, very
79 few strains have been isolated worldwide (Asanovich et al., 1997; Pusterla et al., 1999; Massung
80 et al., 2007; Silaghi et al., 2011; Alberdi et al., 2015). Very few genomes have been sequenced
81 worldwide (33 published genomes, available on
82 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=948>). Molecular tools to study the
83 bacterium and its molecular interactions in cellular models are very limited and currently, there
84 are no commercially available monoclonal antibodies.

85 In 1990, two studies carried out by two different teams led to the discovery of aptamers and the
86 description of the selection method (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990).
87 Aptamers are oligonucleotides (ssDNA, RNA, chemically modified nucleic acids), generally
88 less than 100 nucleotides, characterized by a unique three-dimensional structure. Their folding
89 allow them to interact with their target with high affinity and specificity, *via* Van der Waals,
90 electrostatic or hydrogen bonds (Famulok and Mayer, 2014). Aptamers have been selected
91 against a wide variety of targets, including small compounds, proteins and even viruses,
92 prokaryotic or eukaryotic cells. Since their discovery, there has been growing interest in their
93 use for diagnosis, treatment and bioimaging, in particular in the field of infectious diseases in
94 human/veterinary medicine (Niederlender et al., 2021). Certain aptamers have been developed
95 to control tick-borne diseases. Tabb *et al.* combined aptamers with the SERS (Surface Enhanced
96 Raman Spectroscopy) method for the detection of the OspA protein, which considerably
97 improved the direct detection of the agent responsible for Lyme disease from blood samples
98 (Tabb et al., 2022). Jalali *et al.* have improved the current diagnosis of Crimean-Congo
99 hemorrhagic fever (CCHF), by selecting aptamers against the viral nucleocapsid protein. They
100 have developed an antibody-aptamer sandwich assay, allowing the rapid, sensitive and specific

101 detection of virus in sera (Jalali et al., 2021). Aptamers have significant advantages compared
102 to monoclonal antibodies: better stability, non-toxicity and ease to synthesize (Zhang, *et al.*,
103 2019). Aptamers are obtained by an *in vitro* selection method, named SELEX for Systematic
104 Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (Tuerk and Gold, 1990). The SELEX process
105 consists of repeated selection cycles, including three steps: incubation with the target,
106 amplification of the bound sequences, and generation of single-stranded DNA/ RNA (Xu et
107 al., 2021). In the case of DNA aptamers, a ssDNA library (10^{14} to 10^{15} different sequences) is
108 incubated with the target of interest. Unbound aptamers are washed away while bound
109 oligonucleotides are eluted and then amplified by PCR. Single-stranded DNA is generated from
110 double stranded PCR products to start a new selection cycle.

111 The selection of aptamers against strict intracellular bacteria is particularly challenging and has
112 been poorly described in the literature (Bruno et al., 2016). In fact, the purification of
113 intracellular bacteria is complex, and the final suspension unavoidably contains host cell debris,
114 reducing the chances of selecting aptamers specific to the bacterium and not to components of
115 the host cell. To the best of our knowledge, only one study has developed aptamers against
116 strict intracellular bacteria, and was performed for the specific detection of *Rickettsia typhi*
117 within the genus *Rickettsia* (Bruno et al., 2016). In this study, aptamers were selected against
118 *Rickettsia typhi*, purified on density gradient from murine host cells. After selection, three
119 aptamers demonstrated high affinity and were specific to the family *Rickettsiaceae*. These
120 aptamers were further used for an Enzyme-Linked Fluorescent DNA Aptamer-Magnetic Bead
121 Sandwich assay, which was not able to discriminate between the species of *Rickettsia*, despite
122 the negative selections performed on *R. bellii*, *R. conorii*, *R. parkeri*, and *R. rickettsii* during
123 the selection process. Although *A. phagocytophilum* belongs to the same order (but not the same
124 family) as the genus of *Rickettsia*, these aptamers were not able to bind *A. phagocytophilum* in
125 our hands (*data not shown*).

126 The aim of our study was to develop DNA aptamers against *A. phagocytophilum*, or molecules
127 expressed during the infection. Aptamers would be quintessential tools for *A. phagocytophilum*
128 research as they could facilitate the identification of molecules involved in *A. phagocytophilum*-
129 host interactions or the capture of the bacterium for downstream applications (culture of new
130 strains, bacteria-enrichment for genomic studies or diagnosis). Therefore, a customized SELEX
131 method was applied against an enriched suspension *A. phagocytophilum*, containing DC/RC
132 forms, and bacterial and cellular molecules. After the selection, we demonstrated the ability of
133 three aptamers to bind specifically to infected cells, with high affinity.

134 **2 Materials and Methods**

135 **2. 1 Culture of *A. phagocytophilum***

136

137 The human-derived promyelocytic leukemia cell line HL-60 was purchased from ATCC (CCL-
138 240™, Manassas, VA, USA) and maintained in culture in IMDM medium (Thermo Fisher
139 Scientific, Waltham, USA), supplemented with 20 % fetal calf serum (Thermo Fisher Scientific,
140 Waltham, USA), in 75 cm² flasks. The American human NY18 strain of *A. phagocytophilum*
141 was maintained in HL-60 cells (HL-60 NY18), as previously described (Asanovich et al., 1997,
142 Carlyon, 2005). To monitor *A. phagocytophilum* infection, 100 µL of cell suspension were
143 cytocentrifuged (Shandon Cytospin®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and stained
144 with Hemacolor® kit (Merck, Darmstadt, Germany) for microscopic examination. Following
145 Hemacolor® staining, a HL-60 cell was considered microscopically infected when at least one
146 morula was observed at 1000x magnification. The percentage of microscopically infected cells
147 was determined in three microscopic fields by dividing the number of infected cells by the total
148 number of HL-60 cells. One hundred microliters of HL-60 cells infected at > 70 % were added
149 to a new flask of non-infected HL-60 cells at a final concentration of 2.10⁵ cells/mL. The cells
150 were then incubated at 37 °C with 5 % CO₂.

151 ISE6 embryonic tick cells were maintained according to a previous study (Munderloh et al.,
152 1994). ISE6 tick cells were grown in 5 mL of L15B300 medium in a 25 cm² flask with a pH
153 adjusted to 7.5. The culture medium for the infected cells was supplemented with 0.1 %
154 NaHCO₃ and 10 mM HEPES (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Infected and
155 uninfected cells were incubated at 34 °C. The European ovine strain NV2Os of *A.*
156 *phagocytophilum* (Stuen et al., 2002) and the American human strain NY18 were maintained
157 in ISE6 tick cells: 200 µL of tick cell suspension infected at > 70 % were transferred to a new
158 flask of uninfected cells. Infections were monitored as described above, by cytocentrifugation
159 and Hemacolor® staining.

160 **2. 2 Preparation of an enriched suspension of *A. phagocytophilum* NY18 strain**

161

162 DC infectious and RC replicative forms were purified from HL-60 NY18 cells, to obtain an
163 enriched suspension of *A. phagocytophilum*. The infected cells (2.10⁷ HL-60 NY18) were
164 harvested by centrifugation at 500 x g for 10 min and three cell lysis methods were compared:
165 syringe lysis, Dounce homogenizer and rock tumbler grit. For the first method, the cell pellet

166 was recovered in 4 mL of PBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and then lysed *via*
167 syringe passages, 5 times (5-cc tuberculin syringes, 27-G needles) (Carlyon, 2005). For the
168 second method, the cell pellet was harvested in 10 mL of PBS and was lysed mechanically
169 using a Dounce homogenizer for 20 round trips. For the rock tumbler grit method, cells were
170 suspended in 1.5 mL of IMDM medium and lysed by vortexing twice for 30 s with 60-90 grade
171 silicon carbide (Nguyen Trong et al., 2019). Regardless of the cell lysis method, most cellular
172 debris were removed and pelleted after centrifugation at 750 x g during 5 min. The supernatant
173 was filtered with a 2 µm filter (Merck, Darmstadt, Germany) to remove the remaining debris.
174 *A. phagocytophilum* organisms were finally pelleted by centrifugation at 10,000 x g for 10 min
175 and resuspended in 100 µL of PBS. The final suspension was observed after cytocentrifugation
176 and staining. The viability of the purified bacteria was tested by re-infecting HL-60 cells (2.10⁵
177 cells/mL) with *A. phagocytophilum* enriched suspension obtained by the three lysis methods.
178 After three days of infection, 100 µL of cell suspension were observed following
179 cytocentrifugation and staining. The lysis method that recovered a maximum of *A.*
180 *phagocytophilum* with the least amount of host cell debris was chosen as the target for aptamer
181 selection.

182 **2.3 SELEX library, primers, and aptamer sequences**

183

184 The ssDNA library was prepared and purified by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE),
185 by Eurogentec (Seraing, Belgium). It contains a region of 40 random nucleotides flanked by 20
186 nucleotide-long constant sequences for primer hybridization (5'-
187 CTCCTCTGACTGTAACCACG 40N GCATAGGTAGTCCAGAAGCC-3') (Iqbal et al.,
188 2019). A forward primer (5'-CTCCTCTGACTGTAACCACG-3') was purchased from
189 Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany), and a phosphorylated reverse primer (5'-Phosphate
190 GGCTTCTGGACTACCTATGC-3') was synthesized and purified by HPLC at Eurogentec
191 (Seraing, Belgium). 5'end biotinylated aptamer sequences were synthesized and purified by
192 HPSF at Eurofins (Ebersberg, Germany). Oligonucleotides were stored at a concentration of
193 100 µM at -20 °C.

194 **2.4 SELEX against *A. phagocytophilum* or molecules expressed during the infection**

195

196 SELEX was performed against the enriched suspension of *A. phagocytophilum*, according to
197 the conditions presented in **Table 1** and **Figure 1**. For the first round (R01), 2 nmol of the

198 ssDNA library were prepared in the binding buffer A, composed of PBS with CaCl₂ and MgCl₂
199 (0.9 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 2.6 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 8.05 mM
200 Na₂HPO₄, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in a final volume of 1 mL. The
201 preparation was heated for 5 min at 95 °C, cooled on ice for 3 min to allow folding of aptamers
202 before being incubated at 23 °C. The ssDNA library was then incubated with the enriched
203 suspension of *A. phagocytophilum* at 23 °C for 45 min at 650 rpm (Eppendorf ThermoMixer
204 1.5) in 1.7 mL Eppendorf DNA Lowbinding (Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France). After
205 incubation, unbound sequences were removed after centrifugation at 10,000 x g for 6 min,
206 followed by several washing steps of *A. phagocytophilum*-enriched pellet with 1 mL of binding
207 buffer A. The bound sequences were eluted by heating at 95 °C for 10 min and the supernatant,
208 containing the sequences, was recovered after centrifugation at 10,000 x g for 10 min. After
209 phenol-chloroform DNA extraction, PCR amplification was carried out. The amplification of
210 heterogeneous sequences can lead to the formation of non-specific PCR products, named “PCR-
211 by-products”, due to primer-primer hybridization or binding of primers to complementary
212 bases, present in the variable region (Tolle et al., 2014). As the amplification cycles progress,
213 these “PCR-by-products” accumulate (Tolle et al., 2014). The optimization of the number of
214 amplification cycles at each SELEX is therefore important to limit this phenomenon. A range
215 of PCR cycles from 6 to 25 cycles was therefore performed at each SELEX round in a 25 µL
216 reaction volume. The PCR mix included GoTaq Flexi Buffer 1X (Promega, Wisconsin, USA),
217 200 µM of dNTPs (Invitrogen, Waltham, USA), 2.5 mM of MgCl₂, 1.25 units of GoTaq G2
218 Hot Start Polymerase, 2.5 µL of DNA template and 0.5 µM of forward and phosphorylated
219 reverse primers. All PCR reactions were conducted according to the following program: an
220 initial DNA denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 6 to 25 cycles of denaturation (6, 8,
221 10, 12, 15, 20 and 25 cycles) at 95 °C for 30 s, annealing at 58 °C for 30 s, elongation at 72 °C
222 for 15 s, finished by a final extension at 72 °C for 60 s. PCR products were revealed on a 4 %
223 agarose gel stained with BET in TAE 1X buffer at 90 V for 2 h. The optimal number of PCR
224 cycles was then applied for large-scale PCR, performed in a final volume of 2 mL (50 µL of
225 mix reaction per tube). All the amplification products were pooled and purified using the
226 Nucleospin™ gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany). The purity and
227 concentration of the purified PCR product were checked and quantified by ImageJ software
228 after gel electrophoresis with a quantitative size marker (Quick-Load Purple Low Molecular
229 Weight DNA Ladder, NEB, Massachusetts, USA). All purified PCR products (2 µg for each
230 reaction) were converted into ssDNA by lambda exonuclease digestion. The generation,

231 purification and quantification of ssDNA were performed as previously described (Le Dortz et
232 al., 2022).

233 A total of 12 cycles of SELEX (R01-R12) were performed (**Table 1, Figure 1**). During the
234 selection process, the conditions were modified by adding BSA (1 mg/mL, Merck, Darmstadt,
235 Germany), tRNA (5 mg/mL Merck, Darmstadt, Germany) and salmon sperm DNA (0.1 mg/mL,
236 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) as non-specific competitors from R03, by increasing
237 the number and time of washing steps (from one to five washing cycles, from 6 min to 30 min),
238 by decreasing the incubation time (from 45 to 30 min) and the number of infected cells (from
239 $3 \cdot 10^7$ to $2 \cdot 10^7$ cells).

240 To avoid selection of non-specific sequences, negative selection against uninfected host cell
241 debris, derived from HL-60 cells lysed with a Dounce homogenizer, was performed from R04
242 before the positive selection. The ssDNA pools were first incubated with uninfected HL-60 cell
243 debris for 45 min at 23 °C agitated at 650 rpm. After centrifugation at 10,000 x g for 10 min,
244 unbound sequences in the supernatant were recovered and used for positive selection. The
245 number of HL-60 cells used for negative selection was increased as the selection cycles
246 progressed (from $3 \cdot 10^7$ to $4 \cdot 10^7$ cells). After the eighth round, the library was split in half: one
247 half was used for four more rounds (R09 to R12) under the same conditions (positive selection),
248 while the other half was used for four more rounds (named Rc09 to Rc12) against host cell
249 debris from uninfected HL-60 cells (negative control selection).

250 **2.5 Monitoring the evolution of SELEX by quantitative PCR**

251

252 The evolution of SELEX was monitored by qPCR and melting curve analysis, performed on
253 the final ssDNA pool obtained at each round of SELEX (R02-R12). Quantitative PCRs were
254 conducted in a reaction volume of 20 μ L, composed of 1X Luminaris Color HiGreen qPCR
255 Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 5 μ M of aptamer primers and 2 μ L of
256 ssDNA pools, diluted at 1:100 in ultrapure water. The program consisted of an initial
257 denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 10 s, 58 °C for 15 s
258 and 72 °C for 30 s. Melting curves were obtained at the end of qPCR by heating products to 95
259 °C for 15 s, cooling it down to 58 °C for 1 min and heating to 95 °C with an increment of 0.03
260 °C/s. The samples were amplified in duplicates with no-template controls in each run to check
261 for contamination. The amplification curves and melting curves were analyzed with
262 LightCycler 480 software (version 1.5, Roche, Bale, Switzerland).

263 **2.6 Next-Generation Sequencing**

264

265 Aliquots of the library recovered from R04 to R12 for positive selection and from Rc09, Rc11
266 and Rc12 for negative selection were analyzed by Next-Generation Sequencing (NGS) on a
267 iSeq100 instrument (Illumina), as previously described (Quang et al., 2017). For each round,
268 tens of thousands of sequencing reads were analyzed. Analysis was performed using a
269 homemade software (PATTERNITY-seq), as previously described (Nguyen Quang et al.,
270 2018). Access to this software is provided by the MIRCen aptamer platform (CEA, 2021). All
271 fastq files are available on the European Nucleotide Archive (ENA) at
272 <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB62495>. First, sequences of 35 to 42 nucleotides
273 between primer binding sites were recovered. The frequency of each sequence in each round
274 was then calculated. All sequences with a frequency of at least 0.02 % in a round were clustered
275 into families based on a Levenstein distance of 8 (i.e., all sequences with less than 8
276 substitutions, deletions or insertions are grouped into the same family, **Supplementary Table**
277 **S1**). The frequency of each family was then calculated for each round (**Supplementary Table**
278 **S2**). Multiple alignment of families was performed by MultAlin (Corpet,1988)
279 (**Supplementary Table S3**), and structure prediction was performed using Mfold software.
280 NGS analysis was used to select candidate aptamers for binding studies.

281 **2.7 Determination of binding affinity by flow cytometry analysis**

282 The chosen aptamers and the scramble sequence were synthesized with a 5'-end biotinylation
283 (**Table 2**). The scramble corresponds to a sequence randomly designed and not selected during
284 the SELEX. This sequence was therefore used as a control to evaluate the presence of non-
285 specific interactions. First, the biotinylated aptamers were coupled to streptavidin-AF 647 nm
286 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) using a 3:1 aptamer: streptavidin-AF 647 nm ratio
287 with 1 μ M of aptamer. The complex was incubated at 4 °C for 30 min in the binding buffer A.
288 For K_d determination, different concentrations of aptamers were prepared (0 nM, 30 nM, 50
289 nM, 75 nM, 100 nM and 250 nM) in 100 μ L of binding buffer A with 1 mg/mL of BSA, 5
290 mg/mL of tRNA and 0.1 mg/mL of salmon sperm DNA.

291 Second, *A. phagocytophilum* was labelled with Cell Tracker 5-chloromethylfluorescein
292 diacetate (CMFDA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), to identify *A. phagocytophilum*
293 infected cells (Carlyon, 2005). The bacteria were purified from HL-60 NY18 cells using a
294 Dounce homogenizer and filtration, as described above. The enriched suspension was then

295 incubated with 10 μ M of CMFDA for 15 min at 37 °C. After incubation, 1 mL of PBS was
296 added, and two washing steps were performed with 2 mL of PBS by centrifugation at 10,000 x
297 g for 10 min. The final pellet was suspended in 100 μ L of IMDM medium and then added to a
298 new flask of HL-60 cells at a concentration of $2 \cdot 10^5$ cells/mL (Carlyon, 2005).

299 Third, three days post-infection, CMFDA-labelled HL-60 NY18 or HL-60 cells ($1 \cdot 10^6$ cells)
300 were harvested by centrifugation at 500 x g for 5 min and washed with 1 mL of binding buffer
301 A. The unfixed cells were then incubated with the conjugated aptamers at 23 °C for 30 min
302 under agitation at 650 rpm. In total, four washing steps were performed by centrifugation at 500
303 x g for 3 min with 500 μ L of binding buffer A.

304 Then, the final pellet was suspended in 200 μ L of binding buffer A, before being analyzed on
305 BD FACSCanto II (BioScience) with FlowJo™ software (version 10.8.1). The samples were
306 tested in duplicates and the experiments were performed independently in triplicates. The
307 negative control, corresponding to streptavidin AF-647nm, was used and prepared in the same
308 conditions as aptamers. The median fluorescence intensity (MFI) of scramble sequence was
309 subtracted from the MFI of each sequence to eliminate non-specific background. Finally, Kd
310 (constant dissociation) and Bmax (maximum of fluorescence intensity) values were determined
311 by a non-linear regression analysis using GraphPadPrism 9® software.

312 **2.8 Study of aptamer binding to HL-60 NY18 or HL-60 cell lysates by fluorescence** 313 **microscopy**

314
315 The binding of aptamers was tested against HL-60 or HL-60 NY18 cell lysates. To obtain the
316 lysates, $1 \cdot 10^7$ HL-60 or HL-60 NY18 cells were harvested by centrifugation at 500 x g for 10
317 min and washed with 1 mL of PBS. The cells were suspended in 10 mL of PBS and then lysed
318 using a Dounce homogenizer (20 round trip). After centrifugation at 750 x g for 5 min, the
319 supernatant was filtered with 2 μ m filter. The final lysate was recovered after centrifugation at
320 10,000 x g for 10 min. In the case of HL-60 NY18 cells, the bacteria were labelled with
321 CMFDA, as described above. The conjugated aptamers (10 nM) were then incubated with the
322 cell lysates for 30 min at 23°C at 650 rpm. After incubation, four washes were performed with
323 500 μ L of binding buffer A, by centrifugation at 10,000 x g for 3 min. The final pellet was
324 resuspended in 100 μ L of binding buffer A and this suspension was cytocentrifuged on a
325 microscopic slide, mounted in Prolong Antifade Diamond Mounting containing DAPI (Thermo

326 Fisher Scientific, Waltham, USA). The slides were examined with immersion oil using a Leica
327 DMI8 confocal microscope. The experiment was performed in triplicates.

328 **2.9 Study of aptamer binding to HL-60 or HL-60 NY18 cells by fluorescence microscopy** 329

330 In a first experiment, the binding of the conjugated aptamers was tested against 1.10^6 CMFDA-
331 labelled HL-60 NY18 cells, harvested after three days of infection or 1.10^6 HL-60 cells. The
332 unfixed cells were incubated with 50 nM of the conjugated aptamers at 23 °C for 30 min at 650
333 rpm. After incubation, four washes were performed with 500 µL of binding buffer A, by
334 centrifugation at 500 x g for 3 min. The final pellet was resuspended in 100 µL of binding buffer
335 A and this suspension was cytocentrifuged on a microscopic slide and prepared for confocal
336 microscopy, as described above. Each experiment was performed in triplicates.

337 In a second experiment, the conjugated aptamers (50 nM) were incubated with 1.10^6 CMFDA-
338 labelled HL-60 NY18 cells, after different times of infection (12 h, 24 h, 48 h and 72 h post-
339 infection), according to the protocol described above.

340 In a third experiment, the binding of the conjugated aptamers (50 nM) was tested against 1.10^6
341 CMFDA-labelled HL-60 NY18 cells at 4 °C. Three days post-infection, the infected cells were
342 harvested, maintained for 1 h at 4°C and incubated with the conjugated aptamers for 30 min at
343 4 °C at 650 rpm. The four washes were also performed at 4 °C and the microscopic slide was
344 prepared, as described above.

345 The average fluorescence intensity of each sequence was calculated with the ImageJ software.
346 The outline of each cell was manually selected (region of interest), as well as a background
347 region. The average signal intensity (red channel) of the background region of interest was
348 subtracted from the average signal strength of the region of interest. Thirty cells were analyzed
349 for one experiment. In total, three experiments were performed independently (90 cells
350 analyzed in total). The colocalization between the red pixels (conjugated aptamer) and the green
351 pixels (*A. phagocytophilum*) was estimated with the Pearson correlation coefficient (PCC),
352 obtained using the JacoP Plugin (ImageJ software) (Bolte and Cordelières, 2006). For this,
353 individual cells were selected, and a composite image (red and green) was created by JacoP
354 Plugin to estimate PCC. No threshold was applied. Ten cells were analyzed for one experiment,
355 the average of PCC was then calculated for the three experiments, performed independently.

356 **2.10 Impact of trypsin pre-treatment on aptamer binding**

357

358 After three days of infection, 1.10^6 CMFDA-labelled HL-60 NY18 cells were harvested at 500
359 x g for 10 min and washed with 1 mL of PBS buffer. The cell pellet was incubated with 500 μ L
360 of 1 X trypsin and 0.53 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) at 37 °C for 10
361 min or 30 min. After incubation, trypsin was inactivated by adding 500 μ L of fetal calf serum.
362 After centrifugation at 500 x g for 10 min, the cell pellet was washed with 500 μ L of PBS buffer
363 and used in the aptamer binding assay, as described above for fluorescence microscopy. The
364 experiment was performed in triplicates.

365 **2.11 Study of aptamer binding in tick cells by fluorescence microscopy**

366

367 Finally, the binding of aptamers was tested against ISE6 cells, ISE6 cells infected with *A.*
368 *phagocytophilum* NY18 strain (ISE6 NY18) or ISE6 cells infected with *A. phagocytophilum*
369 NV2Os strain (ISE6 NV2Os). The cells were harvested after centrifugation at 500 x g for 10
370 min and washed with 1 mL of PBS. The conjugated aptamers (50 nM) were incubated with
371 1.10^6 unfixed cells for 30 min at 23 °C at 650 rpm. Four washing steps were performed with
372 500 μ L of the binding buffer A, and the binding was assessed by confocal microscopy, as
373 described above. The experiment was performed in triplicates.

374 **3 Results**

375 **3.1 Preparation of an enriched suspension of *A. phagocytophilum* NY18 strain**

376

377 The first challenge was to purify *A. phagocytophilum* NY18 strain from HL-60 cells. Three cell
378 lysis methods were compared, allowing the recovery of both DC and RC forms of
379 *A. phagocytophilum*. After purification of infected HL-60 cells with syringe lysis, the bacteria
380 were recovered, with large number of cellular debris (**Supplementary Figure S1A**).
381 Contamination with grit was observed after purification by rock tumbler grit method
382 (**Supplementary Figure S1B**). These two purification methods were therefore not optimal. In
383 contrast, purification of heavily infected HL-60 cells with the Dounce homogenizer resulted in
384 important recovery of *A. phagocytophilum* organisms, with few host cell debris
385 (**Supplementary Figure S1C**). The viability of purified *A. phagocytophilum* organisms was
386 confirmed after reinfection of HL-60 cells, as three days post-infection, more than 80 % of cells
387 were infected (**Supplementary Figure S1D**). With this purification method, we obtained an
388 enriched suspension of *A. phagocytophilum*, further used for aptamer selection.

389 **3.2 SELEX against enriched suspension of *A. phagocytophilum* and its monitoring by** 390 **qPCR**

391

392 SELEX was performed against the enriched suspension of *A. phagocytophilum* NY18 strain.
393 To eliminate sequences specific to host-cell components, negative selection was performed
394 against a lysate of non-infected host cells (HL-60).

395 For the first selection rounds (R01-R05), the conditions were chosen according to the
396 recommendations found in the literature (Shangguan, et al., 2015). At the beginning, the
397 selection pressure was high: competitors and negative selection were added from R03 and R04
398 respectively, and the number of washes was increased from R05. The evolution of SELEX was
399 monitored by qPCR. After R06, the selection conditions were adapted, according to the results
400 of the amplification and melting curves obtained by qPCR (**Table 1**) (Luo et al., 2017). For R02
401 to R05, the amplification curves showed a drop in fluorescence, indicating that the ssDNA pool
402 contained many random and non-specific sequences (**Supplementary Figure S2A**). From R06,
403 the fluorescence reached a plateau, indicating a decrease of sequence diversity (Luo et al.,
404 2017). For melting curves, the DNA pools at the end of the elongation phase were denatured
405 slowly, forming stable (homoduplexes) or unstable (heteroduplexes) products. A single peak at
406 a T_m of 64 °C was observed up to R06, corresponding to heteroduplexes, as the diversity of
407 sequences was high and therefore led to non-specific mismatches (**Supplementary Figure**
408 **S2B**). From R06, we observed an increase in stable compounds (homoduplexes with a T_m of
409 79 °C), combined with a decrease in heteroduplexes. These results confirmed the decrease of
410 sequence diversity, associated with the emergence of potential enriched sequences, from R06.
411 After R07, the conditions of selection were not changed to avoid losing potential enriched
412 sequences. SELEX was stopped after R12 since qPCR monitoring showed no difference
413 between R11 and R12, indicating a halt in the evolution of sequences.

414 **3.3 Identification of aptamer candidates by NGS**

415

416 The final ssDNA pools obtained from R04 and R12 were analyzed by NGS. Over 95 % of the
417 sequences obtained by NGS consisted of 40 nucleotides, meaning that non-specific
418 amplification was limited during the selection, partly due to the optimization of the number of
419 PCR cycles at each round (*data not shown*). To focus our analysis on the most enriched
420 sequences, we have retained for analysis only 778 sequences with a frequency greater than 0.02

421 % in at least one cycle. As expected, the frequency of a few sequences strongly increased during
422 SELEX (**Figures 2A and 2B**). Among these sequences, several were grouped in a common
423 family when they were separated by an edit distance lower than 8 (**Supplementary Table S1**).
424 This clustering created 98 families. Interestingly, the number of sequences increased
425 continuously whereas the number of families decreased after R09 (**Figures 2B and 2C**). This
426 was due to the fact that some sequences increase in the library while others, less adapted,
427 decreased (**Supplementary Tables S1 and S2**). The presence of a conserved motif between
428 some of the most amplified sequences was revealed by multiple alignment (**Supplementary**
429 **Table S3**). The choice of candidate aptamers was based on the comparison of the NGS results
430 obtained by our SELEX (R02-R12) vs the control SELEX, performed on HL-60 lysates (Rc09-
431 Rc12). This original strategy allowed us to eliminate several families which, although highly
432 enriched, were more frequent in the control SELEX. This was the case for families 1 and 2,
433 which were progressively enriched, reaching a frequency of 4.16 % and 1.50 % respectively in
434 R12, compared to 15.72 % and 19.37 % in the Rc12 (**Figures 2D, 2E and Supplementary**
435 **Table S2**). As these results strongly suggested that these families would have recognized
436 molecules present in both infected and non-infected cell lysates, they were not selected as
437 candidates for further studies. Applying this strategy, four families were chosen: family 0 (37.73
438 % in R12 vs 2.12 % in Rc12), family 4 (17 % in R12 vs 1.27 % in Rc12), family 8 (3.78 % in
439 R12 vs 0.15 % in Rc12) and family 10 (0.35 % in R12 vs 0.01 % in Rc12) (**Figure 3**). We
440 chose the most frequent variant of each family, named Apta-F0, Apta-F4, Apta-F8 and Apta-
441 F10. A common structure loop for Apta-F8 and Apta-F10 was observed (**Figure 3**). The
442 primary structures of these sequences are presented in **Table 2**, as well as the scramble chosen
443 for binding analysis.

444 **3.4 Determination of binding affinities by flow cytometry analysis**

445
446 The binding affinities of the selected aptamers against unfixed HL-60 cells or *A.*
447 *phagocytophilum* infected cells (HL-60 NY18) were assessed by flow cytometry (**Figure 4**).
448 Aptamers were conjugated with fluorescent streptavidin (AF-647 nm) and *A. phagocytophilum*
449 was labelled with CMFDA. Different concentrations of aptamers were tested against HL-60 or
450 HL-60 NY18 cells.

451 The scramble did not bind to HL-60 or HL-60 NY18, as indicated by the median fluorescence
452 intensities (MFI) close to the negative control (streptavidin AF-647 nm only) (**Figure 4A**). The

453 absence of binding for the scramble sequence validated our cell staining parameters, as we did
454 not observe non-specific interactions. For uninfected HL-60 cells, all aptamers obtained MFI
455 values close to the scramble sequence, indicating that aptamers did not bind specifically to HL-
456 60 cells.

457 In contrast, data obtained for Apta-F4, Apta-F8 and Apta-F10 against infected cells showed a
458 typical saturation curve, these aptamers interacted with the infected cells in a concentration-
459 dependent manner (**Figure 4B and 4C**). The binding of these sequences was significantly
460 higher compared to the scramble. Conversely, for Apta-F0, little or no fluorescence signal was
461 obtained with HL-60 NY18. Therefore, K_d of this sequence was not determined. The average
462 of K_d and range of B_{max} values obtained for three experiments were calculated from specific
463 binding curve against HL-60 NY18 and are presented in **Table 3**. The average K_d was in the
464 nanomolar range from 4.74 to 40.48 nM, depending on the sequences. The binding study by
465 flow cytometry demonstrated the high affinities of Apta-F4, Apta-F8 and Apta-F10 against cells
466 infected with *A. phagocytophilum* NY18 strain.

467 **3.5 Study of aptamer binding in HL-60 and HL-60 NY18 cells by fluorescence microscopy**

468

469 The binding of aptamers was then studied by confocal microscopy, to confirm the previous
470 results and to visualize their localization in the cells. For each experiment, aptamers were
471 conjugated with fluorescent streptavidin (AF-647 nm), *A. phagocytophilum* was labelled with
472 CMFDA and nuclei were labelled with DAPI.

473

474 First, aptamers were tested against a lysate of uninfected cells (HL-60) or infected cells (HL-
475 60 NY18) to confirm that aptamers did not recognize an intracellular molecule present in
476 uninfected cells. The results confirmed the absence of recognition of the HL-60 cell lysate, by
477 any of the preselected aptamers and the presence of binding against HL-60 NY18 cell lysates
478 for Apta-F4, Apta-F8 and Apta-F10 (**Figure 5**). For Apta-F0, we obtained the same binding as
479 for the scramble sequence. This experiment confirmed that Apta-F4, Apta-F8 and Apta-F10
480 recognized a target only expressed in infected cells.

481

482 Second, the conjugated aptamers were incubated with unfixed HL-60 cells or HL-60 NY18
483 cells, after three days of infection. The objective was to localize the binding sites. No binding
484 was observed for the scramble, demonstrating the absence of non-specific signal (**Figure 6**).
485 As expected, uninfected cells were not recognized by any of aptamers. For Apta-F0, no

486 fluorescence was observed for HL-60 NY18 cells, consistent with the low values obtained by
487 flow cytometry. In contrast, significant binding was observed for Apta-F4, Apta-F8 and Apta-
488 F10 in HL-60 NY18 cells, compared to the scramble (**Figure 6B**). These aptamers provided an
489 intracellular signal and recognized infected cells. Noticeably, the red and green pixels seem to
490 overlap for Apta-F4, Apta-F8 and Apta-F10. The colocalization between aptamers (red) and *A.*
491 *phagocytophilum* (green) was further analyzed, by estimating the Pearson correlation
492 coefficient (**Figure 6C**). This coefficient ranged between 0.53 and 0.63, indicating partial
493 colocalization between the two channels. A perfect colocalization corresponds to a Pearson
494 correlation coefficient of 1, a negative colocalization to -1 and the absence of colocalization to
495 zero (Bolte and Cordelières, 2006). For the intermediate values between -0.5 to 0.5, no
496 conclusion can be drawn (Bolte and Cordelières, 2006).

497
498 Third, aptamers were incubated with unfixed HL-60 NY18 cells after 12 h, 24 h, 48 h or 72 h
499 of infection (**Figure 7**). Each sequence showed different binding profiles during infection and
500 appeared to recognize different types of targets. Apta-F4 was able to recognize its target from
501 24 h of infection, with a weak binding (**Figure 7B**). The level of binding increased between 24
502 h and 72 h post-infection (**Figure 7B**). Apta-F8 binding was already observed from 12 h post-
503 infection and increased as the infection progressed (**Figure 7B**). Interestingly, Apta-F10 was
504 able to bind to its target at 12 h post-infection and then only after 72 h of infection (**Figure 7B**).

505
506 An additional experiment was performed to determine whether aptamers could be internalized
507 by active pathways, including endocytosis. The conjugated aptamers were therefore incubated
508 at 4 °C with HL-60 NY18 cells, harvested after three days of infection. At this temperature, no
509 active transport occurs (Hernandez et al., 2013). As expected, no binding was detected for
510 scramble and Apta-F0 (**Supplementary Figure S3**). Conversely, strong binding was observed
511 for Apta-F4, Apta-F8 and Apta-F10. This temperature did not affect the intracellular binding
512 of these aptamers. Endocytosis pathways do not appear to be involved in the internalization of
513 aptamers. These results argue in favor of passive entry of aptamers into cells naturally
514 permeabilized by *A. phagocytophilum* infection, rather than active internalization.

515 **3.6 Impact of trypsin pre-treatment on aptamer binding against HL-60 NY18 cells**

516
517 To determine whether these aptamers recognize proteins, highly infected HL-60 NY18 cells
518 were treated with trypsin for 10 or 30 min, prior to aptamer incubation. Trypsin, as a serine

519 protease, hydrolyzes proteins into small peptides. The impact of trypsin pre-treatment on
520 aptamer binding is presented in **Figure 8**. For Apta-F8, binding was considerably reduced after
521 10 min of trypsin treatment (**Figure 8B**). For Apta-F4 and Apta-F10, a reduction of binding
522 was observed after 30 min of treatment (**Figure 8B**). However, since trypsin was incubated
523 with the infected cells for 30 min, we could therefore question the reality of its complete
524 inactivation. Trypsin may have degraded the fluorescent streptavidin coupled to aptamers. The
525 same experiment was therefore performed using aptamers directly coupled to AF-647 nm. No
526 binding was observed for all the sequences after 30 min of trypsin pre-digestion
527 (**Supplementary Figure S4**). This experiment confirm that trypsin was well inactivated. The
528 absence of binding indicates that the aptamer targets have been digested by trypsin. These
529 aptamers therefore recognize protein structures.

530 **3.7 Study of aptamer binding in tick cells by fluorescence microscopy**

531
532 Aptamer binding was tested against ISE6 cells infected by *A. phagocytophilum* NY18 strain or
533 by the ovine strain NV2Os. The results were observed by confocal microscopy and compared
534 with those obtained by binding against non-infected ISE6 cells. Aptamers were conjugated with
535 fluorescent streptavidin (AF-647 nm) and nuclei were labelled with DAPI. Unfortunately, the
536 kinetics of *A. phagocytophilum* infection in tick cells did not allow us to label *A.*
537 *phagocytophilum* in this model of infection. CMFDA-labelled *A. phagocytophilum* remain
538 fluorescent for up to 4 days (Carlyon, 2005). However, approximately two weeks are required
539 to observe infection with *A. phagocytophilum* in ISE6 tick cells. A previous assay using
540 CMFDA was performed in tick cells and failed to label *A. phagocytophilum* (*data not shown*).

541 For non-infected ISE6 cells, no binding was detected for all aptamers (**Figure 9**). When these
542 cells were infected with the NY18 strain, only Apta-F8 was able to bind infected ISE6 cells
543 (**Figure 9A and 9B**).

544 For ISE6 cells infected with the ovine strain NV2Os, low non-specific interactions were
545 observed for the scramble (**Figure 9A and 9B**). For Apta-F4 and Apta-F10, the binding was
546 not statistically different from that of the scramble. In contrast, Apta-F8 demonstrated
547 significant binding. This aptamer therefore recognized a molecule also expressed during the
548 invertebrate infection model. However, we cannot draw any conclusions about the localization
549 of its binding site.

550

551 4 Discussion

552
553 Developing aptamers as new tools is a real opportunity for the study of *A. phagocytophilum*,
554 both for basic research and for downstream applications. To reach this goal, DNA aptamers
555 were chosen as they are more advantageous over RNA aptamers, due to their higher stability,
556 easier selection and amplification processes, longer shelf-life and low cost (Wang et al., 2019).
557 As a target, we chose to work with the NY18 strain of *A. phagocytophilum*, isolated from a
558 human patient in the USA (Asanovich et al., 1997). This strain is interesting for studying the
559 interactions between the bacterium and its invertebrate/vertebrate host since it can be grown
560 rapidly in both culture models (Reppert et al., 2014).

561
562 Selecting aptamers against strict intracellular pathogens is challenging and has been described
563 only once in the literature to date (Bruno, et al. 2016). In our study, we implemented a
564 customized selection method with original strategies that could help researchers in the selection
565 of aptamers against strict intracellular targets, both pathogens and molecules expressed during
566 cell infection. The main challenge was to obtain aptamers specific to molecules related to *A.*
567 *phagocytophilum* infection, and not aptamers directed against molecules from uninfected cells
568 as the presence of cell debris cannot be avoided (Shamah, et al., 2008). Even if the purification
569 of *A. phagocytophilum* by a Dounce homogenizer provides a suspension enriched in bacteria, a
570 small amount of host cell components is still present. To counteract this problem, we applied
571 negative selection against host cell lysates at each round starting at R04. In addition, the
572 selection conditions were monitored according to the results of qPCR, as proposed in a previous
573 study (Luo, et al., 2017) and to NGS. The results obtained with these two methods were
574 consistent with each other. We therefore strongly advise researchers to apply qPCR analysis at
575 each round of selection and to adapt their SELEX conditions accordingly. NGS is a more
576 expensive method and can therefore be applied at the end of the selection process to confirm
577 qPCR results and identify aptamer sequences. According to the literature, the enrichment
578 against pure targets is usually observed between R08 and R12 and depends on the conditions
579 of selection (Shamah, et al., 2008). A previous study has selected aptamers against
580 *Enterococcus faecalis* with the enrichment observed from R09 (Kolm et al., 2020). Negative
581 selection was not applied for each round and only two competitors were used (BSA and salmon
582 sperm DNA). Interestingly, we succeeded in a rapid sequence enrichment from R06, despite
583 the complexity of our target. We applied more stringent selection conditions than those found
584 in the literature, with a negative selection performed in each round, the use of three competitors

585 at high concentration and the large number of washing steps. However, despite the negative
586 selection, it is not uncommon to observe the enrichment of non-specific sequences, which can
587 lead to the SELEX failure. To identify non-specific sequences, an original strategy was applied
588 from R09, by performing in parallel a control SELEX against host cell components. The
589 comparison of the NGS results obtained with the control SELEX and our SELEX helped us
590 select the best potential candidates (Apta-F0, Apta-F4, Apta-F8 and Apta-F10) for further
591 binding studies. As expected, several sequences were more enriched in the control SELEX,
592 despite negative selection, and were consequently eliminated.

593

594 Despite its high frequency, Apta-F0 was not able to bind to infected lysates/cells. This
595 phenomenon is not uncommon and could result from its random presence in the selected pool
596 (Oteng, et al., 2020). In contrast, Apta-F4, Apta-F8 and Apta-F10 have interesting properties.
597 First, they demonstrated no binding to components of uninfected cells, confirming that our
598 selection strategy was effective. Second, these three aptamers displayed a high affinity, in the
599 nanomolar range, against infected cells (HL-60 NY18). Third, Apta-F4, Apta-F8 and Apta-F10
600 were characterized by an intracellular binding, with a partial colocalization with *A.*
601 *phagocytophilum*. *A. phagocytophilum* infection weakens the HL-60 cell membranes. After 72
602 hours of infection, most of the infected HL-60 cells begin to lyse and the remaining intracellular
603 morulae are dispersed (Lai et al., 2009). Thus, the entry of aptamers in the unfixed infected
604 cells could be explained through two hypotheses. Given the fragility of the cell membrane,
605 aptamers could enter the infected cells and bind to an intracellular target, or they could
606 recognize a receptor present at the surface of infected cells and then be internalized. Such a
607 process of aptamer internalization *via* binding to a receptor membrane followed by an
608 endocytic pathways (clathrin-mediated endocytosis, caveolin-mediated endocytosis or
609 macropinocytosis) has been already described (Yoon and Rossi, 2018). To test this hypothesis,
610 endocytosis was inactivated with an incubation temperature of 4 °C (Hernandez et al., 2013).
611 Interestingly, intracellular binding of Apta-F4, Apta-F8 and Apta-F10 was not affected at this
612 temperature. Passive entry of aptamers into cells naturally permeabilized by
613 *A. phagocytophilum* infection seems more likely than active internalization by recognition of a
614 surface target. However, these very preliminary studies do not rule out the possibility that both
615 routes of entry could be involved. Further work is needed to investigate these hypotheses.

616 Finally, the target of Apta-F8 is also expressed in the invertebrate model infected with two
617 different strains: the American human NY18 strain and the European ovine strain NV2Os.

618 Aptamers seem to recognize a molecule expressed by a pathway common to both cell models
619 during the infection, or *A. phagocytophilum* itself. In contrast, Aptamers F4 and F10 only bind
620 to the infected vertebrate model HL-60 NY18. The mechanisms of interactions in the
621 vertebrate/invertebrate cell model remain poorly studied and little known. Some studies have
622 shown that *A. phagocytophilum* employs common strategies in HL-60 and tick cells, such as
623 the inhibition of apoptosis and the generation of ROS species, while others pathways are
624 specific to the cellular model (Alberdi et al., 2016; Villar et al., 2015; de la Fuente et al., 2016).
625 The three selected aptamers are therefore particularly interesting for a better understanding of
626 the interactions between bacteria and cells in the vertebrate and/or invertebrate model during
627 their infection by *A. phagocytophilum*.

628 At this stage of the study, we cannot conclude that aptamers recognize *A. phagocytophilum*,
629 given the colocalization results. The results obtained after trypsin pre-treatment on highly
630 infected cells gave us an indication of the type of targets. Given the fragility of the membrane
631 and the duration of the incubation (30 min), the natural entry of trypsin was certainly facilitated.
632 Trypsin was able to access the intracellular contents and thus degrade the surface proteins and
633 very probably the intracellular proteins. Moreover, a previous study showed that trypsin is taken
634 up by mammalian cell lines and found in the cytoplasm (Hodges et al., 1973). Given the absence
635 of binding after treatment, the three aptamers certainly recognize a protein structure that can be
636 digested by proteases. The selection was performed on a lysate of infected cells enriched in *A.*
637 *phagocytophilum* organisms. Thus, the potential targets of these aptamers could be a protein on
638 the surface of bacteria (DC or RC forms), or bacterial/cellular molecules secreted during
639 infection. The kinetic studies performed in HL-60 NY18 cells demonstrated that the targets of
640 the different aptamers are expressed at different times of infection, with probably different
641 functions during the infection process. The target of Aptamer F8 is expressed earlier from 12 h of
642 infection. At this time of infection, the internalized DC bacteria start to become RC forms, to
643 initiate the replication (Troese and Carlyon, 2009). For Aptamer F4, the target is expressed later,
644 from 24 h post-infection, which corresponds to a majority of RC forms within individual
645 inclusions in host cells (Troese and Carlyon, 2009). Aptamer F10 was only able to bind its target
646 at two time points during the infection: at 12 h and 72 h. At both time points, *A.*
647 *phagocytophilum* is mainly present in its DC form (Troese and Carlyon, 2009).

648
649 Of importance, most of the molecules implicated in the infection by *A. phagocytophilum* are
650 not identified and/or their functions are hypothetical (Dunning Hotopp, et al., 2006). For DC

651 forms, only a few adhesins/invasins have been studied so far, such as Asp14 or OmpA involved
652 in the adhesion and entry into cells (Kahlon, et al., 2013; Ojogun, et al., 2012; Naimi, et al.,
653 2020). RC forms are known to express some specific proteins, mostly implicated in replication.
654 For example, APH-0032 is found only on the surface of the RC forms and is located on the
655 vacuole membrane, expressed from 20 h post-infection (Oki et al., 2016). Some proteins are
656 expressed commonly on the surface of both forms, such as the AmpA protein, which
657 accumulates throughout the infection (Beyer et al., 2015). Bacterial proteins are also secreted
658 via the type IV secretion system (T4SS) (Rikihisa, 2011). For example, the protein AnkA is
659 secreted and crossed the vacuolar membrane to reach the nucleus of host cells, to decrease the
660 generation of ROS species (Kim et al., 2022). This protein is also able to bind to nuclear
661 proteins, ATC-rich sequences, and transcriptional regions of the CYBB locus. Another T4SS
662 protein, Ats-1, secreted into the host cell cytoplasm, is located in the mitochondria and inhibits
663 apoptosis (Niu et al., 2010). Ats-1 also inhibits autophagy by binding host-cell proteins located
664 on the surface of the cytoplasmic vacuole where the RC forms develop. During infection, host
665 cells express specific proteins, including proteins located on the surface of cytoplasmic
666 vacuoles (such as Beclin-1 and LC3), proteins of the endosome recycling pathway (Rab
667 proteins), and/or proteins involved in plasma lipid transport (cholesterol) (Rikihisa, 2011)...
668 Finally, it has been shown that *A. phagocytophilum* infection leads to the activation of multiple
669 host tyrosine kinases, mitogen-activated protein kinases (ERK1-2), and the production of
670 cytokines/chemokines (Alberdi, et al., 2016; Rikihisa, 2011). All these proteins could be
671 potential targets for our aptamers. With regard to surface receptors, only PSGL-1 is currently
672 identified as a key receptor for *A. phagocytophilum* entry into human neutrophils (Truchan et
673 al., 2013). The presence of PSGL-1 on the surface of HL-60 cells is considered to be a key
674 factor in their permissiveness towards *A. phagocytophilum* (Truchan et al., 2013). Given the
675 lack of binding to uninfected HL-60 cells, it is unlikely that this receptor is a target for these
676 aptamers. The next step is therefore to identify the targets of our aptamers, to determine whether
677 they are known or unknown proteins and to explore in depth their role in cellular infection by
678 *A. phagocytophilum*, in vertebrate and/or invertebrate models.

679
680 In conclusion, our work opens the opportunity to enhance research, diagnostic, and therapeutic
681 approaches. Aptamers with the ability to identify cells infected by *A. phagocytophilum* may
682 improve our understanding of the mechanisms of infection interactions. This could lead to the
683 development of novel therapeutic strategies and potentially allow the delivery of drugs
684 specifically targeting infected cells. The development of a method for capturing the bacterium

685 in blood samples is a longer-term prospect, requiring further development, as target
686 identification remains to be done. This method looks promising for the isolation and enrichment
687 of *A. phagocytophilum* from blood samples, for diagnostic purposes and in-depth genomics
688 studies.

689 **5** Captions of figures

690

691 **Figure 1.** Schematic illustration of the SELEX performed against enriched suspension of *A.*
692 *phagocytophilum* NY18 strain. The final ssDNA pool was analyzed by qPCR and NGS for
693 enrichment analysis. Negative selection was introduced from R04 against HL-60 cell lysates.

694 **Figure 2.** NGS analysis of SELEX. Sequences whose frequency is higher than 0.02 % at least
695 in one cycle have been recovered. The library was split after the eighth round to compare the
696 evolution of the families during four additional rounds of SELEX (positive selection, solid
697 lines) vs four rounds of SELEX on cell extracts from uninfected cells (negative selection,
698 dashed lines). **(A)** Percentage in the library corresponding to sequences whose frequency is
699 higher than 0.02 % at least in one round. **(B)** Number of sequences whose frequency is higher
700 than 0.02 %. **(C)** Number of families (sequences have been clustered in families based on an
701 edit distance of 8). **(D)** Evolution of the frequency of the 20 most amplified families in the
702 library during different rounds of SELEX. **(E)** Frequency of the most enriched families in the
703 last round of SELEX (R12) compared to their frequency ratio (R12/Rc12) in Log₂ to highlight
704 those that are more enriched under positive selection compared to negative selection
705 (corresponding to a ratio greater than 0). The dashed region indicates 3 families with a
706 conserved motif. The red dots represent the candidate aptamers selected for binding evaluation.

707 **Figure 3.** Evolution of the frequency and predicted secondary structures of the four aptamer
708 candidates chosen for binding evaluation. The structure prediction was performed using Mfold.
709 A conserved sequence between Apta-F8 and Apta-F10 is colored in blue. The evolution of the
710 frequency of these aptamer candidates in rounds of positive and negative selection are presented
711 in solid line and dashed line, respectively.

712 **Figure 4.** Binding study of selected sequences against HL-60 or HL-60 NY18 cells, by flow
713 cytometry, for one experiment. Different concentrations of the conjugated aptamers (from 0 to
714 250 nM) were incubated with unfixed cells. **(A)** MFI values obtained for scramble or
715 streptavidin-AF 647 nm incubated with HL-60 (red line) or HL-60 NY18 (blue line) cells. Each
716 aptamer concentration was tested in duplicate. Error bars represent the standard deviation of

717 the duplicates. **(B1, B2, B3, B4)** Result of specific binding of the aptamer against HL-60 cells
718 (red line) or HL-60 NY18 cells (blue line). The MFI values of the scramble were subtracted
719 from each MFI value. Each aptamer concentration was tested in duplicate. Error bars represent
720 the standard deviation of the duplicates. **(C)** Representation of the specific binding of aptamers
721 against HL-60 NY18 cells. The MFI values of the scramble were subtracted from each MFI
722 value. Each aptamer concentration was tested in duplicate. Error bars represent the standard
723 deviation of the duplicates.

724 **Figure 5.** Confocal microscopy binding study against HL-60 and HL-60 NY18 cell lysates.
725 Nuclei were labelled with DAPI (blue), and biotinylated aptamers were pre-conjugated with
726 streptavidin-AF-647 nm (red). *A. phagocytophilum* NY18 strain was labelled with CMFDA
727 (green). Scale bars represents 10 μ m.

728 **Figure 6. (A)** Confocal microscopy binding studies against HL-60 and HL-60 NY18 cells.
729 Aptamers were incubated with the unfixed cells. Nuclei were labelled with DAPI (blue) and
730 biotinylated aptamers were pre-conjugated with streptavidin-AF-647 nm (red). *A.*
731 *phagocytophilum* NY18 strain was labelled with CMFDA (green), to obtain fluorescent HL-60
732 NY18. Scale bars represents 5 μ m. **(B)** Representation of the average fluorescence intensity of
733 each sequence (red channel), quantified by ImageJ software. Values were obtained after
734 subtraction of background noise. Experiments were performed in triplicates (90 cells analyzed
735 per sequence). **(C)** Quantitative study of colocalization by measuring the Pearson correlation
736 coefficient, obtained for Apta-F4, Apta-F8 and Apta-F10 (JacoP PlugIn). The experiments were
737 performed in triplicates (30 cells per experiment).

738 **Figure 7. (A)** Confocal microscopy binding studies during *A. phagocytophilum* infection.
739 Aptamers were incubated with unfixed HL-60 NY18 cells after 12 h, 24 h, 48 h or 72 h
740 infection. Nuclei were labelled with DAPI (blue), and biotinylated aptamers were pre-
741 conjugated with streptavidin-AF-647 nm (red). *A. phagocytophilum* NY18 strain was labelled
742 with CMFDA (green). Scale bars represents 10 μ m. The experiments were performed in
743 triplicates, independently of each other. **(B)** Representation of the average fluorescence
744 intensity of each sequence (red channel), quantified by ImageJ software. Values were obtained
745 after subtraction of background noise. Experiments were performed in triplicates (90 cells
746 analyzed per sequence).

747 **Figure 8. (A)** Confocal microscopy binding studies against HL-60 NY18 cells with/ without
748 trypsin pre-treatment. After three days of infection, HL-60 NY18 cells were pre-treated with

749 trypsin for 10 or 30 min. Aptamers were then incubated with the unfixed cells. Nuclei were
 750 labelled with DAPI (blue), and biotinylated aptamers were pre-conjugated with streptavidin-
 751 AF-647 nm (red). *A. phagocytophilum* NY18 strain was labelled with CMFDA (green). Scale
 752 bars represents 10 μ m. The experiments were performed in triplicates, independently of each
 753 other. **(B)** Representation of the average fluorescence intensity of each sequence (red channel),
 754 quantified by ImageJ software. Values were obtained after subtraction of background noise.
 755 Experiments were performed in triplicates (90 cells analyzed per sequence).

756 **Figure 9. (A)** Confocal microscopy binding studies against ISE6 cells, ISE6 NY18 cells and
 757 ISE6 NV2Os cells. Aptamers were incubated with the unfixed cells. Nuclei were labelled with
 758 DAPI (blue), and the biotinylated aptamers were pre-conjugated with streptavidin-AF-647 nm
 759 (red). **(B)** Representation of the average fluorescence intensity of each sequence (red channel),
 760 quantified by ImageJ software. The values were obtained after subtraction of background noise.
 761 The experiments were performed in triplicates (90 cells analyzed per sequence).

762 **6 Tables**

763

764 **Table 1** SELEX conditions performed against the enriched suspension of *A. phagocytophilum*
 765 NY18 strain. The red stars correspond to conditions that have been modified between two
 766 successive rounds.

SELEX round	ssDNA concentrations		Total number of cells		Incubation parameters			Melting curves		Adaptation of conditions
	Quantity	Concentration	HL-60 NY18	HL-60	Temperature incubation time	Washing	Competitors	Hetero duplexes	Homo duplexes	Comments
R01	2 nmol	2 μ M	$3 \cdot 10^7$	-	23 °C 45 min 650 rpm	1X 1 mL, 6 min	-	Presence	Absence	-
R02	0.03 nmol*	0.5 μ M	$3 \cdot 10^7$	-	23 °C 45 min 650 rpm	1X 1 mL, 6 min	-	Presence	Absence	Decrease in the initial amount of ssDNA
R03	0.1 nmol*	0.5 μ M	$3 \cdot 10^7$	-	23 °C 45 min 650 rpm	1X1 mL, 10 min*	BSA, tRNA, salmon sperm DNA*	Presence	Absence	Introduction of competitors
R04	0.01 nmol*	0.5 μ M	$3 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^{7*}$	23 °C 45 min 650 rpm	1X 1 mL, 10 min	BSA, tRNA, salmon sperm DNA	Presence	Absence	Introduction of negative selection

R05	0.01 nmol	0.34 μ M*	3.10 ⁷	4.10 ⁷ *	23 °C 45 min 650 rpm	3X 1 mL, 30 min*	BSA, tRNA, salmon sperm DNA	Presence	Absence	Increased number of healthy cells and washing steps
R06	0.01 nmol	0.34 μ M	2.10 ⁷ *	4.10 ⁷	23 °C 30 min 650 rpm (1h for negative selection) *	3X 1 mL, 30 min	BSA, tRNA, salmon sperm DNA	Presence	Absence	Decreased number of infected cells
R07	0.01 nmol	0.2 μ M*	2.10 ⁷	4.10 ⁷	23°C 30 min 650 rpm (1h for negative selection)	3X 1 mL, 30 min	BSA, tRNA, salmon sperm DNA	Presence	Absence	Decrease in ssDNA concentrations
R08	0.01 nmol	0.2 μ M	2.10 ⁷	4.10 ⁷	23 °C 30 min 650 rpm (1h for negative selection)	3X 1 mL, 30 min	BSA, tRNA, salmon sperm DNA	Absence	Presence	No modifications
R09	0.01 nmol	0.2 μ M	2.10 ⁷	4.10 ⁷	23 °C 30 min 650 rpm (1h for negative selection)	3X 1 mL, 30 min	BSA, tRNA, salmon sperm DNA	Absence	Presence	No modifications
R10	0.01 nmol	0.2 μ M	2.10 ⁷	4.10 ⁷	23 °C 30 min 650 rpm (1h for negative selection)	3X 1 mL, 30 min	BSA, tRNA, salmon sperm DNA	Absence	Presence	No modifications
R11	0.01 nmol	0.2 μ M	2.10 ⁷	4.10 ⁷	23 °C 30 min 650 rpm (1h for negative selection)	3X 1 mL, 30 min	BSA, tRNA, salmon sperm DNA	Absence	Presence	No modifications
R12	0.01 nmol	0.2 μ M	2.10 ⁷	4.10 ⁷	23 °C 30 min 650 rpm (1h for negative selection)	3X 1 mL, 30 min	BSA, tRNA, salmon sperm DNA	Absence	Presence	No modifications

767

768 **Table 2** Nucleotide sequences of aptamers identified by NGS sequencing. The nucleotides in
769 bold correspond to the variable region.

Scramble	CTCCTCTGACTGTAACCACGAGCCGACTCGGATCTTGGTACGTGCCACTGTTGCATCGTGGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
Apta-F0	CTCCTCTGACTGTAACCACGGCGAAAGCGCGCAGCTGATCTATGGAGCATAATGTTTCGTGGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
Apta-F4	CTCCTCTGACTGTAACCACGTAAATGGTTGGGAATGGGTTGGGTTGGGTTATTACGTGGAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
Apta-F8	CTCCTCTGACTGTAACCACGTTCCCTAAGGTTTCGGTTGTTGTGTGGTTTTTTGAACGTGGGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
Apta-F10	CTCCTCTGACTGTAACCACGGCCCTTTCGTGTAGGTTTCGGTAGTTGGTGGTTTTGCGAAAGGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

770

771 **Table 3** Average Kd and range of Bmax values +/- standard deviation of three experiments,
772 calculated from graphs representing sequence-specific binding.

773

Binding affinity	Apta-F4	Apta-F8	Apta-F10
Kd (nM)	40.48 +/- 13.2	4.74 +/- 2.85	7.55 +/- 3.02
Bmax	[142.6 – 199.4]	[87.04 – 104.1]	[95.03 – 107.8]

774

775 **7** **Conflict of Interest**

776

777 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or
778 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

779

780 **8** **Author Contributions**

781 Conceptualization, L.L.D.; methodology, L.L.D.; software, L.L.D, F.D.; validation, L.L.D,
782 C.R, Q.L, F.D, H.J.B, N.H, P.L.D, A.C.L.; formal analysis, L.L.D, C.R, F.D, H.J.B, N.H,
783 P.L.D, A.C.L.; investigation, L.L.D.; resources, H.J.B, N.H, P.L.D, A.C.L.; data curation,
784 L.L.D.; writing—original draft preparation, L.L.D, F.D.; writing—review and editing, L.L.D,
785 C.R, Q.L, F.D, H.J.B, N.H, P.L.D, A.C.L.; visualization, L.L.D, C.R, Q.L, H.J.B, F.D, N.H,
786 P.L.D, A.C.L.; supervision, H.J.B, N.H, P.L.D, A.C.L.; project administration, H.J.B, N.H,
787 P.L.D, A.C.L.; funding acquisition, H.J.B, N.H, P.L.D, A.C.L.

788

789 **9** **Funding**

790

791 This work was partially funded by the Ecole nationale vétérinaire d’Alfort (EnvA) and was
792 supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and
793 Safety (ANSES). LLD was funded by ABIES from AgroParisTech. UMR BIPAR is
794 supported by the French Government’s Investissement d’Avenir program, Laboratoire
795 d’Excellence “Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases” (grant No. ANR-10-
796 LABEX-62-IBEID).

797

798

799

800 **10 References**
801

- 802 Alberdi, P., Ayllon, N., Cruz, A. C., Bell-Sakyi, L., Zweygarth, E., Stuen, S., et al. (2015).
803 Infection of ixodes spp. tick cells with different anaplasma phagocytophilum isolates
804 induces the inhibition of apoptotic cell death. *Ticks Tick-Borne Dis.* 6, 758. doi:
805 10.1016/j.ttbdis.2015.07.001.
- 806 Alberdi, P., Espinosa, P. J., Cabezas-Cruz, A., and De la Fuente, J. (2016). Anaplasma
807 phagocytophilum Manipulates Host Cell Apoptosis by Different Mechanisms to
808 Establish Infection. *Vet. Sci.* 3, 15. doi: 10.3390/vetsci3030015.
- 809 Asanovich, K. M., Bakken, J. S., Madigan, J. E., Aguero-Rosenfeld, M., Wormser, G. P., and
810 Dumler, J. S. (1997). Antigenic diversity of granulocytic Ehrlichia isolates from humans
811 in Wisconsin and New York and a horse in California. *J. Infect. Dis.* 176, 1029–1034.
812 doi: 10.1086/516529.
- 813 Atif, F. A. (2015). Anaplasma marginale and Anaplasma phagocytophilum: Rickettsiales
814 pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol. Res.* 114, 3941–3957.
815 doi: 10.1007/s00436-015-4698-2.
- 816 Beyer, A. R., Truchan, H. K., May, L. J., Walker, N. J., Borjesson, D. L., and Carlyon, J. A.
817 (2015). The Anaplasma phagocytophilum effector AmpA hijacks host cell
818 SUMOylation. *Cell. Microbiol.* 17, 504–519. doi: 10.1111/cmi.12380.
- 819 Bolte, S., and Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis
820 in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232. doi: 10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x.
- 821 Bruno, J.G., Chao, C.-C., Zhang, Z., Ching, W.-M., Phillips, T., Edge, A., et al. (2016).
822 Preliminary Development of an Enzyme-Linked Fluorescent DNA Aptamer-Magnetic
823 Bead Sandwich Assay for Sensitive Detection of Rickettsia Cells. *Aptamers Synth.*
824 Antibodies, 2(1): 1-12.
- 825 Carlyon, J. A. (2006). Laboratory Maintenance of Anaplasma phagocytophilum. *Curr. Protoc.*
826 Microbiol. 00, 3A.2.1-3A.2.30. doi: 10.1002/9780471729259.mc03a02s00.
- 827 CDC (2022). Anaplasmosis epidemiology and statistics | CDC. *Cent. Dis. Control Prev.*
828 Available at: <https://www.cdc.gov/anaplasmosis/stats/index.html> [Accessed April 10,
829 2023].
- 830 CEA (2021). Aptamers. CEA François Jacob Inst. Biol. Available at:
831 [https://www.cea.fr/drf/ifrancoisjacob/english/Pages/Departments/MIRCen/Platforms/
832 Aptamers.aspx](https://www.cea.fr/drf/ifrancoisjacob/english/Pages/Departments/MIRCen/Platforms/Aptamers.aspx) [Accessed April 13, 2023].
- 833 Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.*
834 16, 10881–10890. doi: 10.1093/nar/16.22.10881.
- 835 Crosby, F. L., Eskeland, S., Bø-Granquist, E. G., Munderloh, U. G., Price, L. D., Al-Khedery,
836 B., et al. (2022). Comparative Whole Genome Analysis of an Anaplasma
837 phagocytophilum Strain Isolated from Norwegian Sheep. *Pathogens* 11, 601. doi:
838 10.3390/pathogens11050601.

- 839 de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., and Kocan, K. M. (2016). *Anaplasma*
840 *phagocytophilum* Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts.
841 *Trends Microbiol.* 24, 173–180. doi: 10.1016/j.tim.2015.12.001.
- 842 Dugat, T., Lagrée, A.-C., Maillard, R., Boulouis, H.-J., and Haddad, N. (2015). Opening the
843 black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future
844 perspectives. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5. doi: 10.3389/fcimb.2015.00061.
- 845 Dumler, J. S. (2012). The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum*
846 infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 64, 13–20. doi: 10.1111/j.1574-
847 695X.2011.00909.x.
- 848 Dunning Hotopp, J. C., Lin, M., Madupu, R., Crabtree, J., Angiuoli, S. V., Eisen, J. A., et al.
849 (2006). Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet.* 2,
850 e21. doi: 10.1371/journal.pgen.0020021.
- 851 Eleftheriou, A., Cole, D., Kieffer, J., and Pesapane, R. (2022). Molecular prevalence of
852 *Anaplasma marginale* and associated risk factors in beef cattle herds from Ohio: a cross-
853 sectional study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 260, 1839–1843. doi:
854 10.2460/javma.22.05.0204.
- 855 Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind
856 specific ligands. *Nature* 346, 818–822. doi: 10.1038/346818a0.
- 857 Famulok, M., and Mayer, G. (2014). Aptamers and SELEX in Chemistry & Biology. *Chem.*
858 *Biol.* 21, 1055–1058. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.08.003.
- 859 Hernandez, L. I., Flenker, K. S., Hernandez, F. J., Klingelhutz, A. J., McNamara, J. O., and
860 Giangrande, P. H. (2013). Methods for Evaluating Cell-Specific, Cell-Internalizing
861 RNA Aptamers. *Pharm. Basel Switz.* 6, 295–319. doi: 10.3390/ph6030295.
- 862 Hodges, G. M., Livingston, D. C., and Franks, L. M. (1973). The localization of trypsin in
863 cultured mammalian cells. *J. Cell Sci.* 12, 887–902. doi: 10.1242/jcs.12.3.887.
- 864 Iqbal, A., Liu, J., Dixon, B., Zargar, B., and Sattar, S. A. (2019). Development and application
865 of DNA-aptamer-coupled magnetic beads and aptasensors for the detection of
866 *Cryptosporidium parvum* oocysts in drinking and recreational water resources. *Can. J.*
867 *Microbiol.* 65, 851–857. doi: 10.1139/cjm-2019-0153.
- 868 Jalali, T., Salehi-Vaziri, M., Pouriayevali, M. H., and Gargari, S. L. M. (2021). Aptamer based
869 diagnosis of crimean-congo hemorrhagic fever from clinical specimens. *Sci. Rep.* 11,
870 12639. doi: 10.1038/s41598-021-91826-8.
- 871 Kahlon, A., Ojogun, N., Ragland, S. A., Seidman, D., Troese, M. J., Ottens, A. K., et al. (2013).
872 *Anaplasma phagocytophilum* Asp14 is an invasin that interacts with mammalian host
873 cells via its C terminus to facilitate infection. *Infect. Immun.* 81, 65–79. doi:
874 10.1128/IAI.00932-12.
- 875 Kim, Y., Wang, J., Clemens, E. G., Grab, D. J., and Dumler, J. S. (2022). *Anaplasma*
876 *phagocytophilum* Ankyrin A Protein (AnkA) Enters the Nucleus Using an Importin- β -
877 RanGTP-Dependent Mechanism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12. Available at:

- 878 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.828605> [Accessed April 9,
879 2023].
- 880 Kolm, C., Cervenka, I., Aschl, U. J., Baumann, N., Jakwerth, S., Krska, R., et al. (2020). DNA
881 aptamers against bacterial cells can be efficiently selected by a SELEX process using
882 state-of-the art qPCR and ultra-deep sequencing. *Sci. Rep.* 10, 20917. doi:
883 10.1038/s41598-020-77221-9.
- 884 Lai, T.-H., Kumagai, Y., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Rikihisa, Y. (2009). The *Anaplasma*
885 *phagocytophilum* PleC Histidine Kinase and PleD Diguanylate Cyclase Two-
886 Component System and Role of Cyclic Di-GMP in Host Cell Infection. *J. Bacteriol.*
887 191, 693–700. doi: 10.1128/JB.01218-08.
- 888 Le Dortz, L. L., Rouxel, C., Leroy, Q., Brosseau, N., Boulouis, H.-J., Haddad, N., et al. (2022).
889 Optimized Lambda Exonuclease Digestion or Purification Using Streptavidin-Coated
890 Beads: Which One Is Best for Successful DNA Aptamer Selection? *Methods Protoc.* 5,
891 89. doi: 10.3390/mps5060089.
- 892 Luo, Z., He, L., Wang, J., Fang, X., and Zhang, L. (2017). Developing a combined strategy for
893 monitoring the progress of aptamer selection. *The Analyst* 142, 3136–3139. doi:
894 10.1039/c7an01131h.
- 895 Massung, R. F., Levin, M. L., Munderloh, U. G., Silverman, D. J., Lynch, M. J., Gaywee, J. K.,
896 et al. (2007). Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma*
897 *phagocytophilum* in a tick cell line. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2138–2143. doi:
898 10.1128/JCM.00478-07.
- 899 Matei, I. A., Estrada-Peña, A., Cutler, S. J., Vayssier-Taussat, M., Varela-Castro, L., Potkonjak,
900 A., et al. (2019). A review on the eco-epidemiology and clinical management of human
901 granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. *Parasit. Vectors* 12, 599. doi:
902 10.1186/s13071-019-3852-6.
- 903 Munderloh, U. G., Liu, Y., Wang, M., Chen, C., and Kurtti, T. J. (1994). Establishment,
904 maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Parasitol.*
905 80, 533–543.
- 906 Naimi, W. A., Gumpf, J. J., Green, R. S., Izac, J. R., Zellner, M. P., Conrad, D. H., et al. (2020).
907 Immunization against *Anaplasma phagocytophilum* Adhesin Binding Domains Confers
908 Protection against Infection in the Mouse Model. *Infect. Immun.* 88, e00106-20. doi:
909 10.1128/IAI.00106-20.
- 910 Nguyen Quang, N., Bouvier, C., Henriques, A., Lelandais, B., and Duconge, F. (2018). Time-
911 lapse imaging of molecular evolution by high-throughput sequencing. *Nucleic Acids*
912 *Res* 46, 7480–7494. doi: 10.1093/nar/gky583.
- 913 Nguyen Trong, T. P., Wang, J., Majzoub-Altweck, M., Fell, S., and Straubinger, R. K. (2019).
914 Recovering host cell-free *Anaplasma phagocytophilum* from HL-60 cells by using rock
915 tumbler grit in comparison to the syringe lysis method. *Ticks Tick-Borne Dis.* 10, 280–
916 285. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.11.001.
- 917 Niederlender, S., Fontaine, J.-J., and Karadjian, G. (2021). Potential applications of aptamers
918 in veterinary science. *Vet. Res.* 52, 79. doi: 10.1186/s13567-021-00948-4.

- 919 Niu, H., Kozjak-Pavlovic, V., Rudel, T., and Rikihisa, Y. (2010). *Anaplasma phagocytophilum*
920 *Ats-1* Is Imported into Host Cell Mitochondria and Interferes with Apoptosis Induction.
921 *PLoS Pathog.* 6, e1000774. doi: 10.1371/journal.ppat.1000774.
- 922 Ojogun, N., Kahlon, A., Ragland, S. A., Troese, M. J., Mastronunzio, J. E., Walker, N. J., et al.
923 (2012). *Anaplasma phagocytophilum* Outer Membrane Protein A Interacts with
924 Sialylated Glycoproteins To Promote Infection of Mammalian Host Cells. *Infect.*
925 *Immun.* 80, 3748–3760. doi: 10.1128/IAI.00654-12.
- 926 Oki, A. T., Huang, B., Beyer, A. R., May, L. J., Truchan, H. K., Walker, N. J., et al. (2016).
927 *Anaplasma phagocytophilum* APH0032 Is Exposed on the Cytosolic Face of the
928 Pathogen-Occupied Vacuole and Co-opts Host Cell SUMOylation. *Front. Cell. Infect.*
929 *Microbiol.* 6, 108. doi: 10.3389/fcimb.2016.00108.
- 930 Oteng, E. K., Gu, W., and McKeague, M. (2020). High-efficiency enrichment enables
931 identification of aptamers to circulating *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.
932 *Sci. Rep.* 10, 9706. doi: 10.1038/s41598-020-66537-1.
- 933 Pusterla, N., Pusterla, J. B., Braun, U., and Lutz, H. (1999). Experimental cross-infections with
934 *Ehrlichia phagocytophila* and human granulocytic ehrlichia-like agent in cows and
935 horses. *Vet. Rec.* 145, 311–314. doi: 10.1136/vr.145.11.311.
- 936 Quang, N. N., Miodek, A., Cibiel, A., and Duconge, F. (2017). Selection of Aptamers Against
937 Whole Living Cells: From Cell-SELEX to Identification of Biomarkers. *Methods Mol*
938 *Biol* 1575, 253–272. doi: 10.1007/978-1-4939-6857-2_16.
- 939 Rar, V., Tkachev, S., and Tikunova, N. (2021). Genetic diversity of *Anaplasma* bacteria:
940 Twenty years later. *Infect. Genet. Evol.* 91, 104833. doi:
941 10.1016/j.meegid.2021.104833.
- 942 Reppert, E., Galindo, R. C., Ayllón, N., Breshears, M. A., Kocan, K. M., Blouin, E. F., et al.
943 (2014). Studies of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep experimentally infected with
944 the human NY-18 isolate: Characterization of tick feeding sites. *Ticks Tick-Borne Dis.*
945 5, 744–752. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.05.014.
- 946 Rikihisa, Y. (2011). Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma*
947 *phagocytophilum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 469–489. doi: 10.1128/CMR.00064-10.
- 948 Shamah, S. M., Healy, J. M., and Cload, S. T. (2008). Complex Target SELEX. *Acc. Chem.*
949 *Res.* 41, 130–138. doi: 10.1021/ar700142z.
- 950 Shangguan, D., Bing, T., and Zhang, N. (2015). “Cell-SELEX: Aptamer Selection Against
951 Whole Cells,” in *Aptamers Selected by Cell-SELEX for Theranostics*, eds. W. Tan and
952 X. Fang (Berlin, Heidelberg: Springer), 13–33. doi: 10.1007/978-3-662-46226-3_2.
- 953 Silaghi, C., Kauffmann, M., Passos, L. M. F., Pfister, K., and Zweygarth, E. (2011). Isolation,
954 propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe
955 deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2, 204–208.
956 doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.09.002.
- 957 Stuen, S., Van De Pol, I., Bergström, K., and Schouls, L. M. (2002). Identification of
958 *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from

- 959 sheep in Norway. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3192–3197. doi: 10.1128/JCM.40.9.3192-
960 3197.2002.
- 961 Tabb, J. S., Rapoport, E., Han, I., Lombardi, J., and Green, O. (2022). An antigen-targeting
962 assay for Lyme disease: Combining aptamers and SERS to detect the OspA protein.
963 *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 41, 102528. doi: 10.1016/j.nano.2022.102528.
- 964 Thiviyathan, V., and Gorenstein, D. G. (2012). Aptamers and the Next Generation of
965 Diagnostic Reagents. *Proteomics Clin. Appl.* 6, 563–573. doi: 10.1002/prca.201200042.
- 966 Tolle, F., Wilke, J., Wengel, J., and Mayer, G. (2014). By-Product Formation in Repetitive PCR
967 Amplification of DNA Libraries during SELEX. *PLoS ONE* 9, e114693. doi:
968 10.1371/journal.pone.0114693.
- 969 Troese, M. J., and Carlyon, J. A. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* dense-cored organisms
970 mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand
971 1. *Infect. Immun.* 77, 4018–4027. doi: 10.1128/IAI.00527-09.
- 972 Truchan, H. K., Seidman, D., and Carlyon, J. A. (2013). Breaking In and Grabbing A Meal:
973 *Anaplasma phagocytophilum* Cellular Invasion, Nutrient Acquisition, and Promising
974 Tools for Their Study. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 15, 1017–1025. doi:
975 10.1016/j.micinf.2013.10.010.
- 976 Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment:
977 RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505–510. doi:
978 10.1126/science.2200121.
- 979 Villar, M., Ayllón, N., Alberdi, P., Moreno, A., Moreno, M., Tobes, R., et al. (2015). Integrated
980 Metabolomics, Transcriptomics and Proteomics Identifies Metabolic Pathways
981 Affected by *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Tick Cells. *Mol. Cell. Proteomics*
982 MCP 14, 3154–3172. doi: 10.1074/mcp.M115.051938.
- 983 Wang, T., Chen, C., Larcher, L. M., Barrero, R. A., and Veedu, R. N. (2019). Three decades of
984 nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on
985 aptamer development. *Biotechnol. Adv.* 37, 28–50. doi:
986 10.1016/j.biotechadv.2018.11.001.
- 987 Xu, Y., Jiang, X., Zhou, Y., Ma, M., Wang, M., and Ying, B. (2021). Systematic Evolution of
988 Ligands by Exponential Enrichment Technologies and Aptamer-Based Applications:
989 Recent Progress and Challenges in Precision Medicine of Infectious Diseases. *Front.*
990 *Bioeng. Biotechnol.* 9. Available at:
991 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.704077> [Accessed July 12,
992 2023].
- 993 Yoon, S., and Rossi, J. J. (2018). Aptamers: Uptake mechanisms and intracellular applications.
994 *Adv. Drug Deliv. Rev.* 134, 22–35. doi: 10.1016/j.addr.2018.07.003.
- 995 Zhang, Y., Lai, B. S., and Juhas, M. (2019). Recent Advances in Aptamer Discovery and
996 Applications. *Mol. Basel Switz.* 24, E941. doi: 10.3390/molecules24050941.
- 997 Zivkovic, Z., Blouin, E. F., Manzano-Roman, R., Almazán, C., Naranjo, V., Massung, R. F., et
998 al. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma marginale* elicit different gene

999 expression responses in cultured tick cells. *Comp. Funct. Genomics* 2009, 705034. doi:
1000 10.1155/2009/705034.
1001

Figure 1. TIF

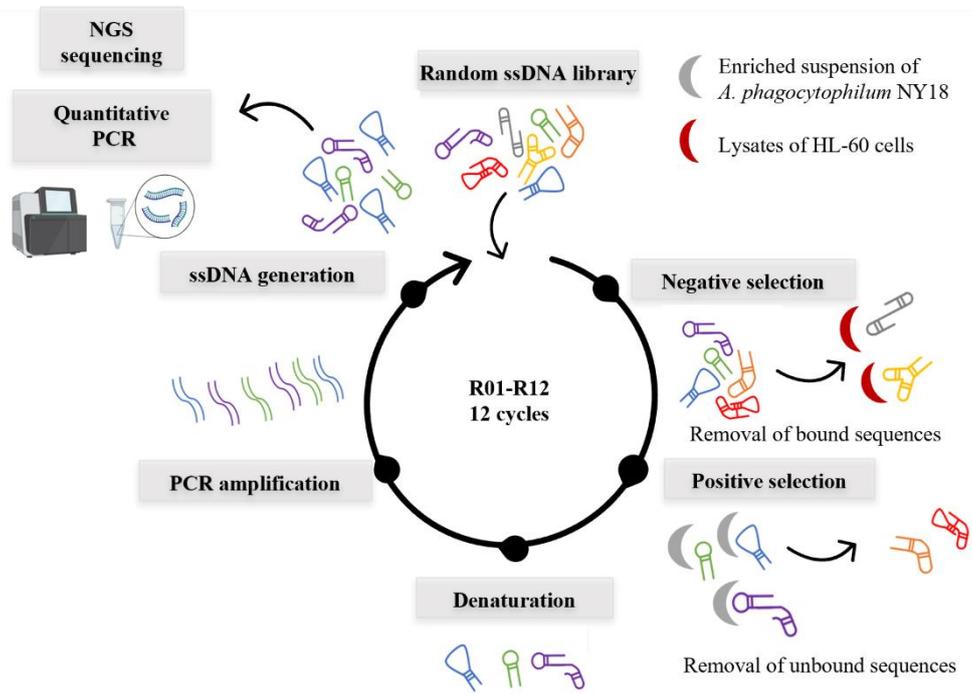


Figure 2. TIF

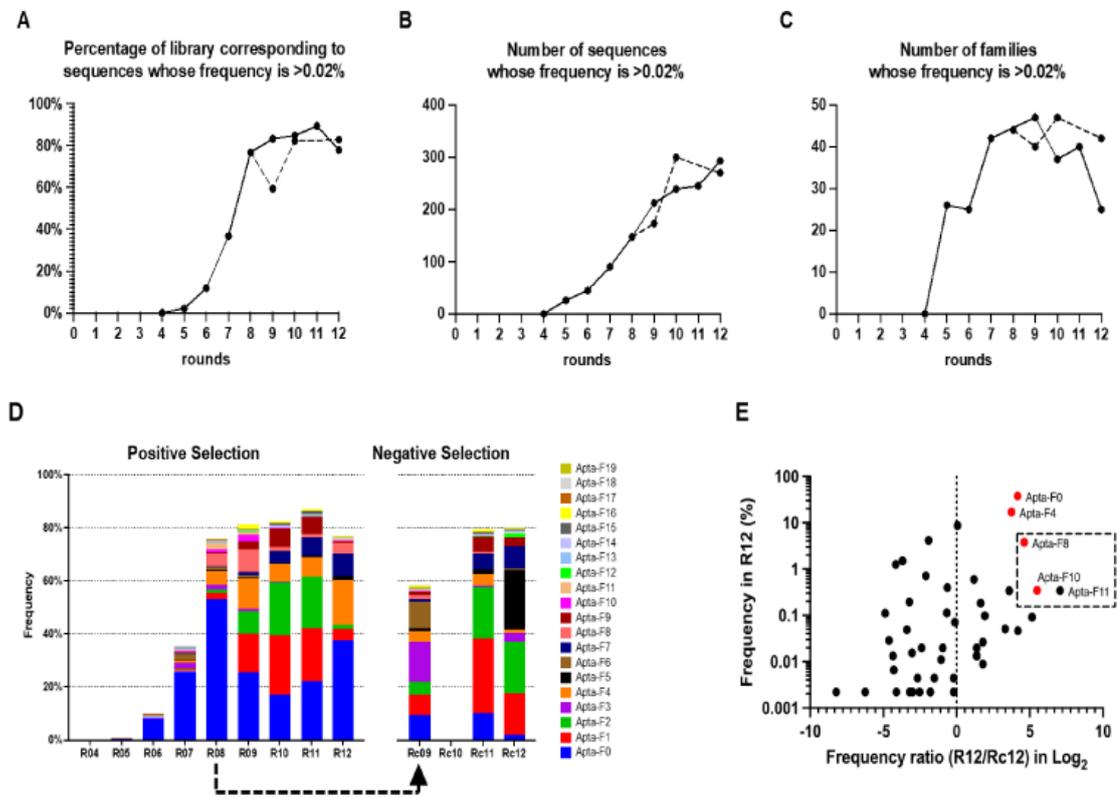


Figure 3. TIF

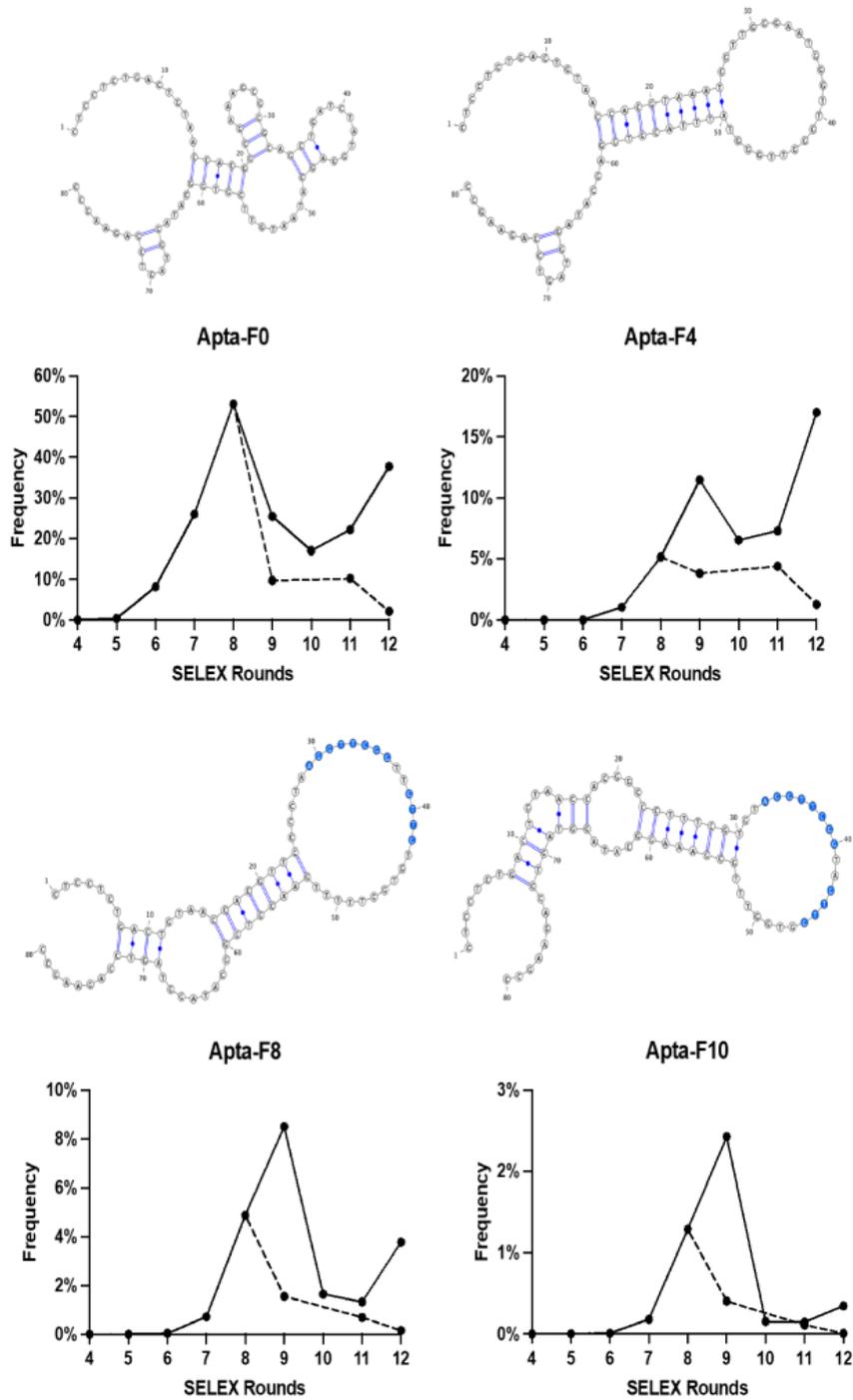


Figure 4. TIF

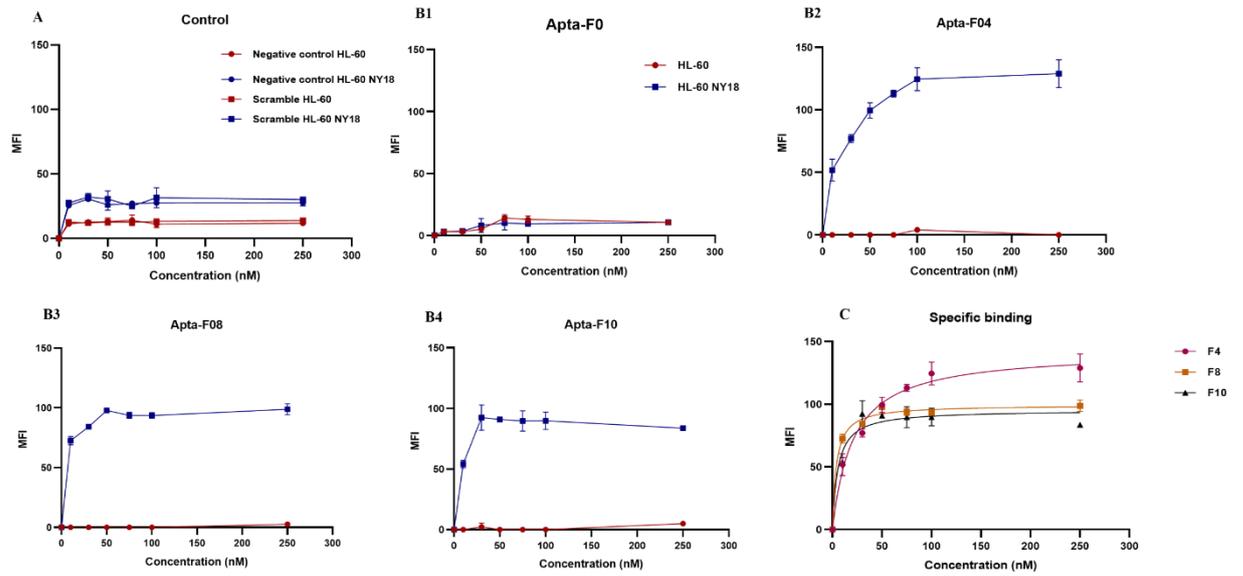


Figure 5. TIF

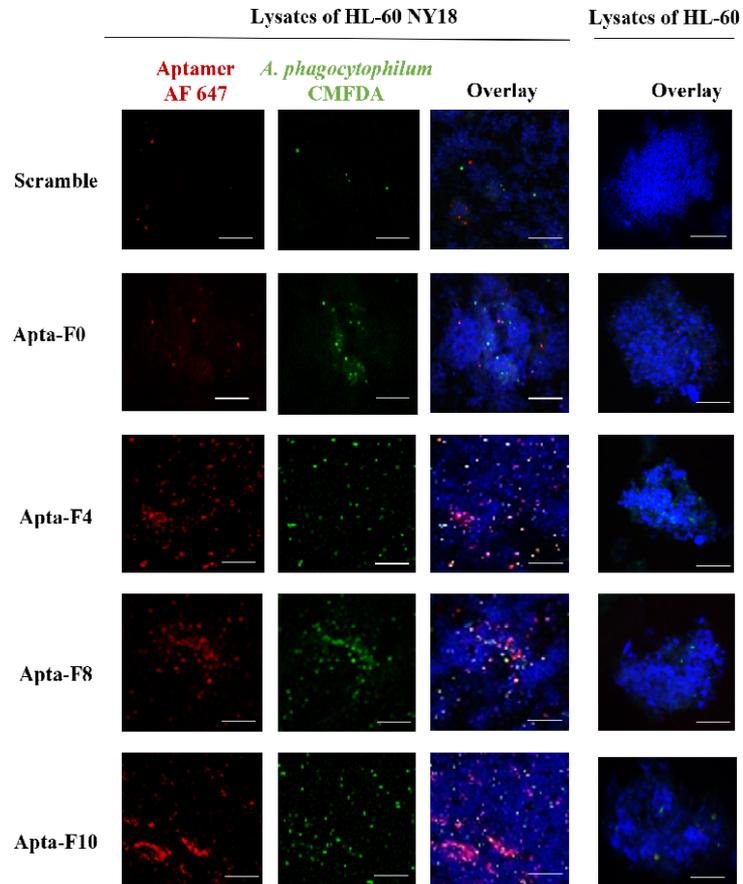


Figure 6. TIF

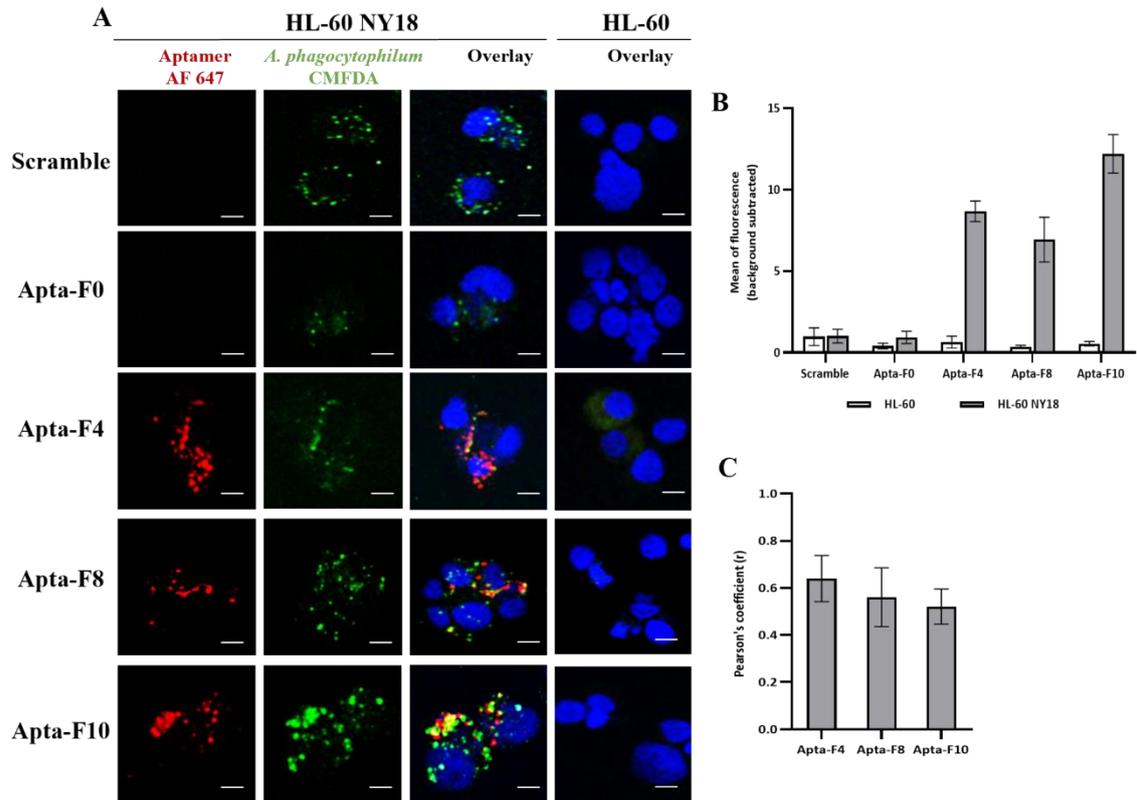


Figure 7. TIF

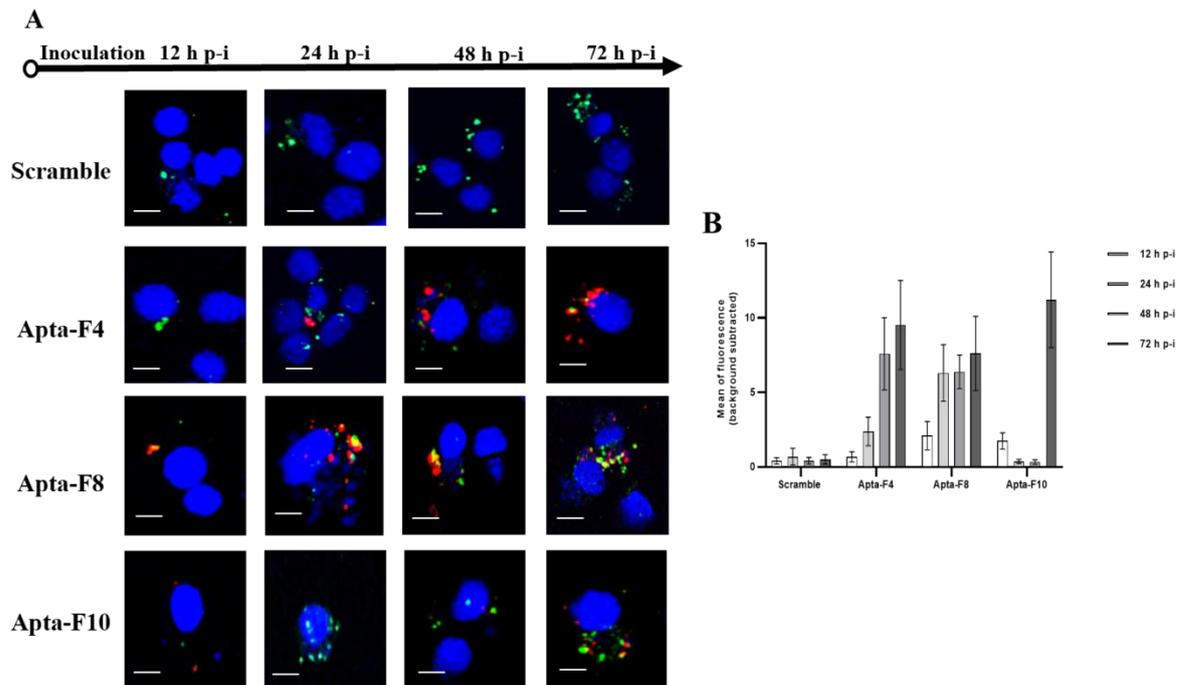


Figure 8. TIF

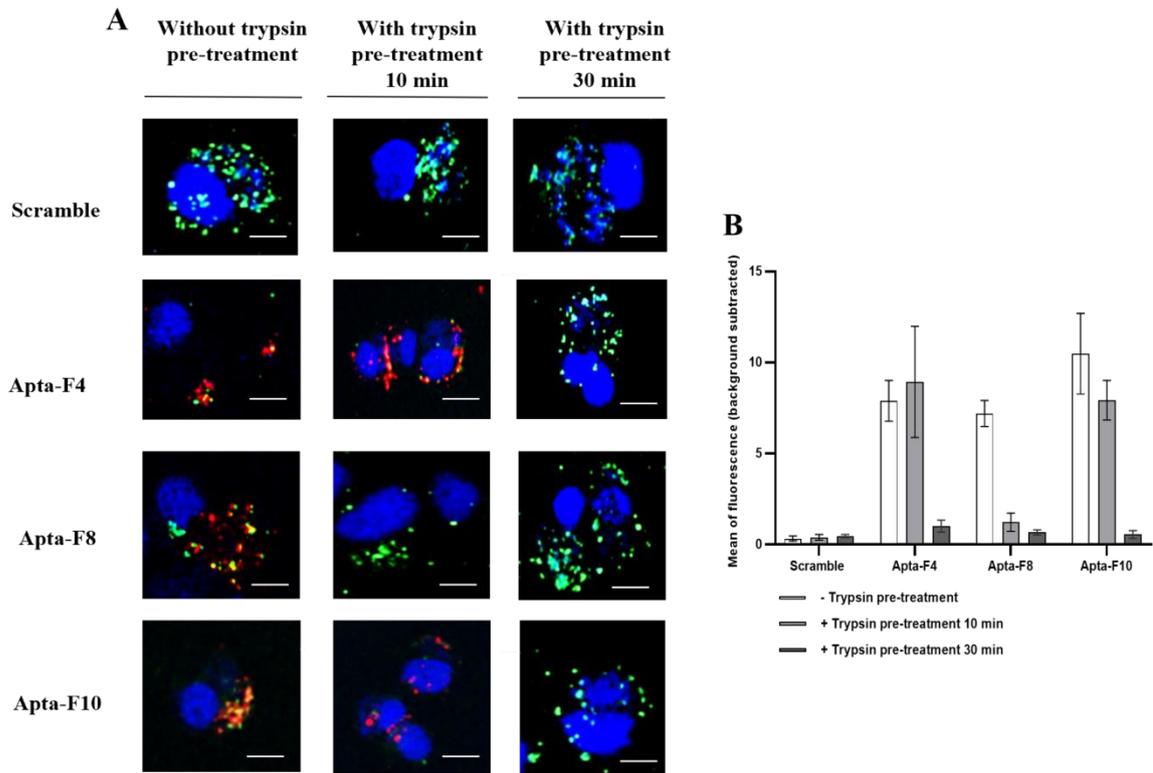
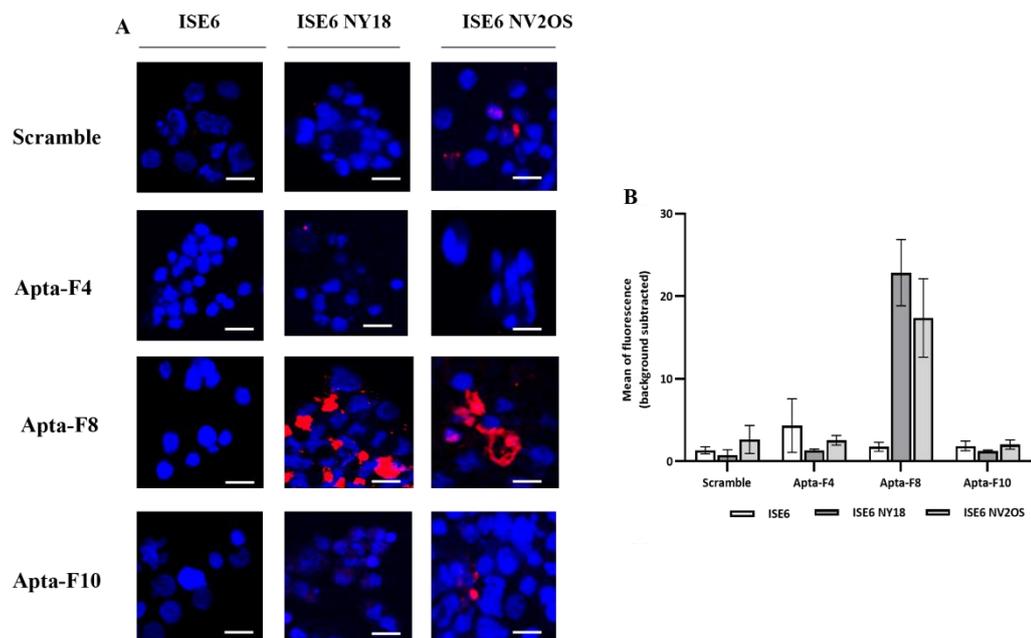


Figure 9. TIF



Supplementary Material

Aptamer selection against cell extracts containing the zoonotic obligate intracellular bacterium, *Anaplasma phagocytophilum*

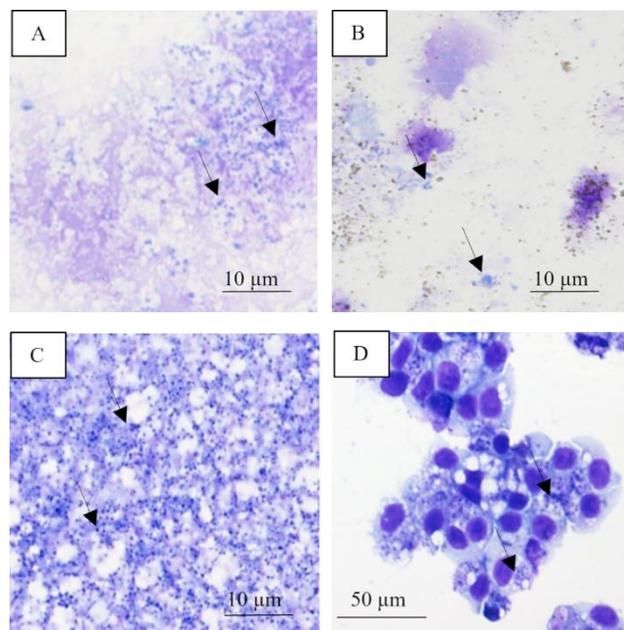
Lisa Lucie Le Dortz¹, Clotilde Rouxel¹, Quentin Leroy¹, Frédéric Ducongé², Henri-Jean Boulouis¹, Nadia Haddad¹, Pierre Lucien Deshuillers¹, Anne-Claire Lagrée¹

* **Correspondence:** Corresponding Author: nadia.haddad@vet-alfort.fr

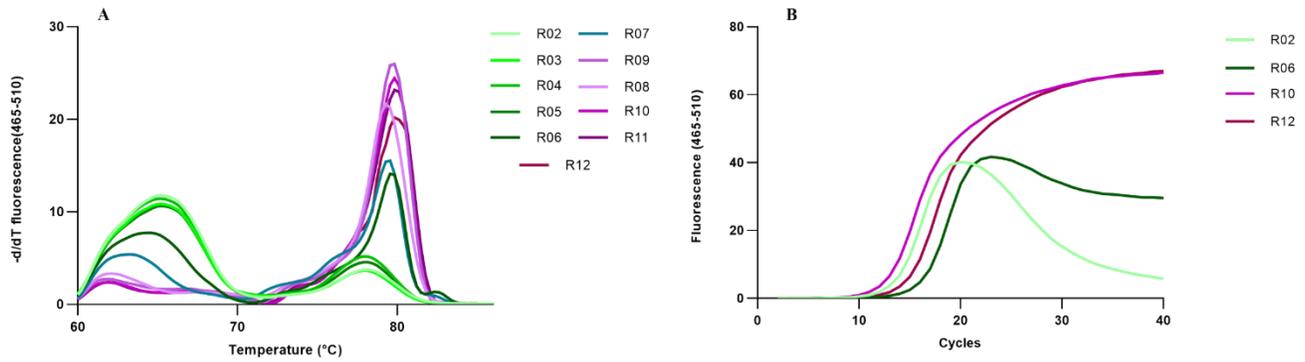
1 Supplementary Data

2 Supplementary Figures and Tables

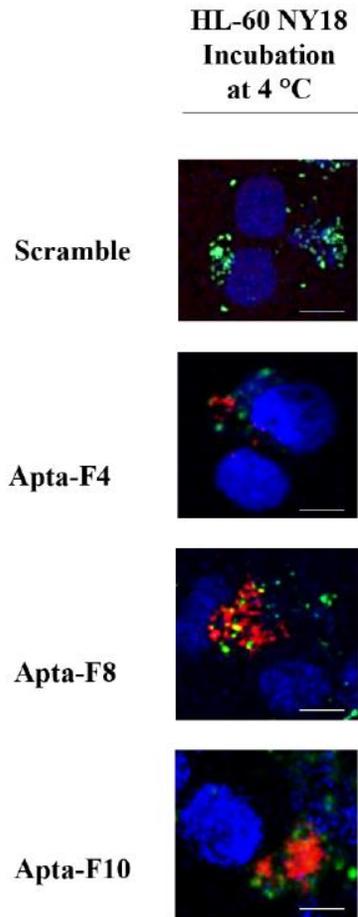
2.1 Supplementary Figures



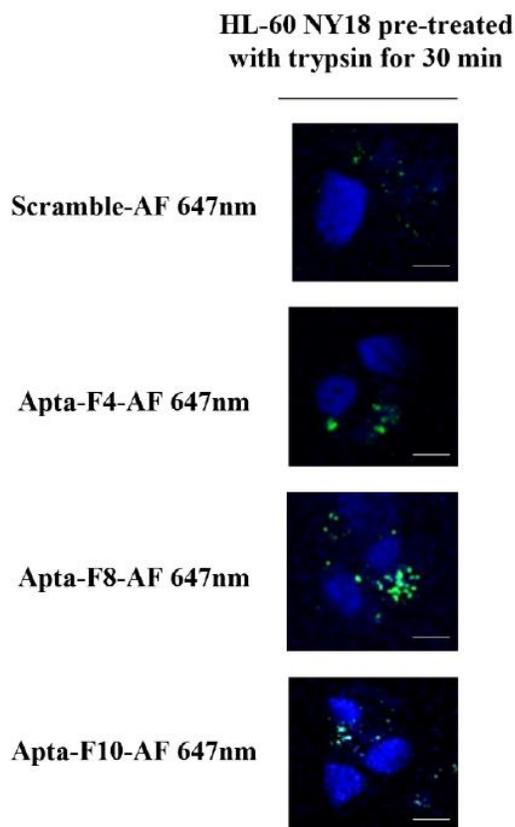
Supplementary Figure S1. Representative image of Hemacolor® stained *A. phagocytophilum* enriched suspension, prepared using syringe lysis and differential centrifugation (A), rock tumbler grit and differential centrifugation (B) or Dounce homogenizer and differential centrifugation (C). (D) Representative image of Hemacolor® stained HL-60 NY18 cells, after three days of infection with the *A. phagocytophilum* enriched suspension, prepared with a Dounce homogenizer. Hemacolor® stained DNA with azur B solution and cationic proteins with eosin. Cytoplasm has a grey color while nuclei are stained in purple. *A. phagocytophilum* is stained in dark purple (arrows).



Supplementary Figure S2. Monitoring of the SELEX by qPCR. **A:** Amplification curves obtained after qPCR of the final ssDNA pool (R02, R06, R10 and R12). **B:** Melting curves obtained after qPCR of the final ssDNA pool, from R02 to R12. A T_m around 64 $^{\circ}\text{C}$ corresponds to heteroduplexes, unstable compounds. A T_m around 79 $^{\circ}\text{C}$ indicates the amplification of homoduplexes, or stable compounds.



Supplementary Figure S3. Confocal microscopy binding studies against HL-60 NY18 cells at 4 $^{\circ}\text{C}$. After three days of infection, the unfixed cells were incubated with aptamers at 4 $^{\circ}\text{C}$. Nuclei were labelled with DAPI (blue) and biotinylated aptamers were pre-conjugated with streptavidin-AF-647 nm (red). *A. phagocytophilum* NY18 strain was labelled with CMFDA (green). Scale bars represents 10 μm .



Supplementary Figure S4. Confocal microscopy binding studies against HL-60 NY18 pre-treated with trypsin. After three days of infection, the cells were pre-treated with trypsin for 30 min. After inactivation, aptamers-647 nm were incubated with the unfixed cells. Nuclei were labelled with DAPI (blue) and aptamers-647 nm in red. *A. phagocytophilum* NY18 strain was labelled with CMFDA (green). Scale bars represents 10 μ m.

2.2 Supplementary Tables

Supplementary Table S1. Sequences clustered into families and their frequencies during SELEX. The frequency of each sequence at different rounds is given as a percentage of the library. This table shows only those sequences containing at least one sequence with a frequency greater than 0.02 % in a round. Sequences were clustered into families using a Levenshtein distance of 8. Sequences evaluated in binding are underlined in yellow.

Supplementary Table S2. Evolution of different families during SELEX. The frequency of each family at different rounds is presented in percentage of the library. Families are composed of sequences clustered using a Levenshtein distance of 8. The sequences that are provided in left correspond to the most abundant of the family. This table presents only the families which contain at least one sequence with a frequency higher than 0.02 % in one round. The sequences evaluated in binding are underlined in yellow.

Supplementary Table S3. Multiple alignment of the most enriched families. Families assessed in binding are highlighted in yellow and their similarity to other families is boxed.

II.A. Discussion et conclusion

La culture de la souche humaine américaine NY18 d'*A. phagocytophilum* dans le modèle cellulaire vertébré HL-60 (HL-60 NY18) est bien maîtrisée dans notre laboratoire et permet d'obtenir rapidement des cellules infectées (environ 3 jours de culture) (Reppert et al., 2014). Cette souche peut également être cultivée dans un modèle cellulaire invertébré de cellules de tiques ISE6, même si la culture de cette souche dans ces cellules est très longue et nécessite 2 à 3 semaines de culture pour obtenir des cellules infectées. La souche NY18 est donc intéressante pour étudier les mécanismes d'interactions de la bactérie dans ces deux modèles cellulaires vertébrés/invertébrés, contrairement aux rares autres souches cultivables disponibles dans notre laboratoire. Pour l'obtention d'aptamères, notre choix s'est donc porté sur la souche humaine américaine NY18 d'*A. phagocytophilum* cultivée dans le modèle cellulaire vertébré HL-60 (HL-60 NY18).

Afin de sélectionner des aptamères contre la bactérie ou des molécules cellulaires ou bactériennes exprimées durant l'infection, la purification d'*A. phagocytophilum* était indispensable. L'objectif était d'obtenir une suspension riche en formes répliquatives (RC) et infectieuses (DC) d'*A. phagocytophilum* et contenant très peu de débris cellulaires. Différentes méthodes de lyse cellulaire ont été comparées : la lyse par passages répétés dans une seringue, la lyse mécanique par l'homogénéiseur de Dounce et l'utilisation de poudre de carbure de silicium. La lyse mécanique des cellules par l'homogénéiseur de Dounce a permis d'obtenir une suspension bactérienne riche en formes RC et DC d'*A. phagocytophilum* et contenant peu de débris cellulaires. Cette suspension enrichie en bactéries a été choisie comme cible pour le SELEX. Par ailleurs, Bruno *et al.* ont sélectionné des aptamères contre *Rickettsia typhi* cultivées sur des cellules hôtes murines et purifiées par gradient de densité (Bruno et al., 2016). La purification par gradient de densité permet de séparer les bactéries des débris cellulaires restants et a été testée dans notre laboratoire en utilisant un gradient de Percoll (Contreras et al., 2017). Cependant, malgré de nombreuses tentatives, cette méthode n'a pas permis de séparer *A. phagocytophilum* des débris cellulaires restants après la lyse mécanique par homogénéiseur de Dounce. Ainsi, la suspension obtenue après purification avec l'homogénéiseur de Dounce contenait inévitablement des composants cellulaires non spécifiques de l'infection, qui sont des cibles potentielles et non souhaitées pour les aptamères en cours de production. En outre, la composition même d'un lysat cellulaire peut nuire au processus de sélection pour deux raisons principales (Goto et al., 2017). D'une part, les nucléases et les protéases contenues dans ce lysat peuvent dégrader les acides nucléiques (dont les aptamères) et les protéines qui constituent les cibles vis-à-vis desquelles la sélection

d'aptamères est souhaitée. D'autre part, le lysat cellulaire peut contenir des quantités importantes de protéines de liaison à l'ADN (histones, facteurs de transcription...) constituant des cibles « parasites » potentielles pour les aptamères, et qui peuvent conduire à l'échec de la sélection.

Des stratégies ont été réfléchies en amont du SELEX pour limiter ces risques. Premièrement, comme mentionné dans l'introduction, la température d'incubation est un paramètre important, qui peut impacter l'affinité des aptamères (Shangguan et al., 2015). Dans notre cas, une température de 37°C a été évitée, en raison de l'activité importante des nucléases à cette température. Une température d'incubation de 4°C a également été exclue, puisque cette dernière ne coïncide pas avec la température nécessaire pour les applications futures. Ainsi, une température de 23°C (température ambiante) a été choisie lors de l'étape d'incubation des aptamères avec notre cible (Shangguan et al., 2015). Deuxièmement, une solution de PBS riche en CaCl₂ et MgCl₂ a été choisie comme tampon de sélection, pour les raisons mentionnées dans l'état de l'art (Shangguan et al., 2015). Différents compétiteurs ont été ajoutés à partir du tour 3 (BSA, ARNt et ADN de sperme de saumon) à des concentrations élevées (Javaherian et al., 2009). La BSA, présente dans le tampon de sélection, entre en compétition avec les autres protéines du lysat cellulaire. Sa présence permet donc d'éliminer les aptamères peu affins pour leur cible. Enfin, l'ARNt et l'ADN de sperme de saumon permettent d'occuper les nucléases et les protéines de liaison à l'ADN et donc de limiter la dégradation des aptamères et les interactions non spécifiques (Javaherian et al., 2009). Troisièmement, une étape de sélection négative réalisée sur un lysat de cellules saines HL-60 a été introduite dès le tour 4 pour éliminer les séquences se liant aux composants cellulaires non spécifiques de l'infection. Enfin, afin d'augmenter la pression de sélection au cours du SELEX, les paramètres suivants ont été modifiés : le nombre et la durée des lavages ont été augmentés, le temps d'incubation et le nombre de cellules infectées initiales ont été réduits. Au total, 12 tours de sélection ont été réalisés. A partir du tour 8, le pool d'ADN simple brin final a été séparé en deux tubes. Pour un tube (SELEX positif), la sélection a été poursuivie comme précédemment. Pour l'autre tube (SELEX contrôle), le pool final d'ADN simple brin a été incubé avec un lysat de cellules HL-60 saines et cette fois-ci, les séquences fixées ont été conservées. Pour ce SELEX contrôle, la sélection a donc été réalisée contre le lysat de cellules saines HL-60. L'objectif était de comparer les résultats de séquençage entre le SELEX positif et le SELEX contrôle pour choisir les meilleurs candidats aptamères.

L'évolution de la sélection a été suivie par PCR quantitative et par séquençage à haut débit, au fur et à mesure du SELEX. Le séquençage et son analyse ont été réalisés par la plateforme MirCen du CEA, dirigée par Frédéric Ducongé. Ces deux méthodes ont montré un enrichissement des séquences à partir du tour 6 de sélection. Les résultats NGS ont permis

d'identifier les séquences enrichies au cours de la sélection. En comparant les résultats NGS du SELEX positif et du SELEX contrôle, nous avons identifié trois groupes de séquences. Premièrement, certaines séquences étaient plus fréquentes dans le SELEX contrôle que dans le SELEX positif. Ces séquences semblent reconnaître des molécules exprimées par les cellules HL-60 saines. Ce résultat remet donc en cause l'efficacité de la sélection négative. Ce phénomène est fréquent dans la littérature, il y a en effet aucune garantie que les séquences non spécifiques soient éliminées lors de l'étape de sélection négative (Bakhtiari et al., 2021). Deuxièmement, certaines séquences étaient aussi fréquentes dans le SELEX positif que dans le SELEX contrôle. Une hypothèse susceptible d'expliquer ce résultat pourrait être liée qu'au fait que le SELEX contrôle n'a été réalisé qu'à partir du tour 8. Le nombre de copies de chaque séquence était donc déjà élevé et il est probable qu'une grande partie de ces copies n'a pu être éliminée lors du SELEX contrôle. Il aurait pu être envisagé de réaliser le SELEX contrôle plus tôt dans la sélection, lorsque l'enrichissement des séquences a commencé à être observé. Cependant, une telle initiative aurait pu compromettre l'enrichissement des séquences recherchées dans la fraction concernée. Enfin, certaines séquences étaient très enrichies dans le SELEX positif et leur fréquence a considérablement chuté dans le SELEX contrôle, notamment Apta-F0, Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10. Ces séquences ont donc été choisies pour les études d'affinité. La réalisation d'un SELEX contrôle en parallèle du SELEX positif, nous a permis de détecter précocement des séquences non spécifiques et donc de réduire le temps et le coût des études d'affinité.

L'affinité de ces séquences pour les cellules saines HL-60 et pour les cellules infectées HL-60 NY18 a été évaluée par cytométrie en flux. Les aptamères, en tant que polyanions, peuvent interagir de manière non spécifique avec des protéines, des lipides et même des récepteurs localisés à la surface des cellules (Kelly et al., 2021). L'utilisation d'une séquence scramble comme témoin négatif nous a permis d'évaluer les interactions non spécifiques avec le type cellulaire testé. Ce témoin est une séquence d'ADN simple brin composée des mêmes régions constantes que les aptamères choisis et avec une région variable conçue aléatoirement. Les résultats de cytométrie en flux ont montré que la séquence Apta-F0 ne reconnaît ni les cellules saines HL-60 ni les cellules infectées HL-60 NY18, malgré sa fréquence élevée au cours du SELEX. Ce phénomène est souvent observé dans la littérature et peut s'expliquer par une séquence parasite plus amplifiable que les séquences d'intérêt (Oteng et al., 2020). Une autre hypothèse peut également être formulée. En effet, les conditions utilisées pour l'étude de l'affinité sont identiques à celles du SELEX. La seule différence est que les séquences sont testées individuellement, lors de l'étude de leur affinité. Nous pouvons donc supposer que Apta-F0 pourrait avoir besoin des autres séquences pour reconnaître sa cible et interagir avec elle. Il aurait donc été intéressant de tester l'affinité d'Apta-F0 en présence des autres

séquences choisies. Ces tests n'ont pu être réalisés par manque de temps. Nous nous sommes concentrés sur les candidats qui nous semblaient directement fonctionnels. Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10 se sont caractérisées par une grande affinité contre les cellules HL-60 NY18, avec un K_d obtenu de l'ordre du nanomolaire. Ces séquences reconnaissent une molécule présente uniquement lors de l'infection, car aucun marquage n'a été observé sur un lysat de cellules saines HL-60.

Ces premiers résultats ont également été confirmés par microscopie confocale. Pour Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10, un marquage intracellulaire a été observé dans les cellules infectées HL-60 NY18. De plus, une colocalisation partielle entre *A. phagocytophilum* et ces trois aptamères a été mise en évidence. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer un tel marquage. Après 72h d'infection, la membrane des cellules infectées par *A. phagocytophilum* est fragilisée et les cellules commencent à se lyser, rendant leur contenu intracellulaire accessible aux aptamères (Lai et al., 2009). Les aptamères peuvent donc se lier à leur cible intracellulaire. La seconde hypothèse est que les aptamères reconnaissent un récepteur de surface des cellules infectées et sont ensuite internalisés par la cellule et se retrouvent dans des compartiments situés à proximité d'*A. phagocytophilum*. Plusieurs études ont montré que les voies d'endocytose peuvent être impliquées dans l'internalisation des aptamères, suite à la reconnaissance de récepteurs ou de protéines membranaires (Yoon and Rossi, 2018; Wan et al., 2019). Cependant, le marquage intracellulaire d'Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10 a également été observé à 4°C dans les cellules infectées HL-60 NY18. A cette température, les voies de transport par endocytose sont inactivées. Au vu de ce premier résultat, l'internalisation des aptamères par voie active et donc par reconnaissance de récepteurs ou de protéines membranaires semble peu probable. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ou non cette hypothèse. Il serait également intéressant d'utiliser des marqueurs de compartiments intracellulaires, comme le dextran (endosomes), pour définir exactement la localisation des aptamères dans les cellules infectées (Zhang et al., 2022).

A cette étape de l'étude, nous ne pouvons pas conclure que les aptamères sélectionnés reconnaissent *A. phagocytophilum*. La sélection a été réalisée contre une suspension enrichie en bactéries obtenue à partir de cellules infectées. Les cibles potentielles peuvent être des molécules exprimées à la surface des formes DC et/ou RC d'*A. phagocytophilum* ou des molécules cellulaires/ bactériennes exprimées lors de l'infection à *A. phagocytophilum*. En ce qui concerne les récepteurs de surface, seule la glycoprotéine PSGL-1 a été identifiée comme essentielle à l'internalisation et l'infection de cellules HL-60 et des granulocytes neutrophiles humains (Truchan et al., 2013). Cependant, cette glycoprotéine est également présente à la surface des cellules saines HL-60. Compte tenu de l'absence de liaison des aptamères aux

cellules HL-60, il est peu probable que cette glycoprotéine soit une cible pour les aptamères. Les aptamères pourraient éventuellement reconnaître cette glycoprotéine dans une conformation spécifique à l'infection par *A. phagocytophilum*. Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude n'a montré un changement de conformation de cette glycoprotéine suite à l'infection.

Pour explorer les cibles des aptamères, trois expériences ont été réalisées. Premièrement, les cellules infectées HL-60 NY18 ont été prétraitées avec de la trypsine, pendant 10 ou 30 minutes, avant d'être incubées avec les aptamères. La trypsine est une protéase capable de cliver la lysine et l'arginine. En raison de la fragilité membranaire des cellules infectées, nous pouvons supposer que la trypsine a eu accès au contenu intracellulaire et a donc pu digérer à la fois les protéines de surface mais également les protéines cytosoliques des cellules infectées. Après pré-traitement avec la trypsine pendant 30 min, le marquage intracellulaire des aptamères a été considérablement réduit. Cette perte de marquage indique donc que les cibles d'Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10 sont sûrement des protéines. Deuxièmement, les aptamères ont été incubés avec les cellules HL-60 NY18 à différents temps d'infection (12h, 24h, 48h et 72h). Apta-F8 et Apta-F10 se caractérisaient par une structure commune de type tige boucle, nous avons émis l'hypothèse que ces aptamères pouvaient reconnaître une cible identique. Cependant, il a été intéressant de constater que les trois aptamères étudiés reconnaissent des cibles protéiques exprimées à différents temps d'infection. Troisièmement, les aptamères ont été testés sur un modèle de cellules de tiques ISE6 infectées, soit par la souche NY18 (ISE6 NY18), soit par la souche européenne ovine NV2Os (ISE6 NV2Os). Seule Apta-F8 a reconnu sa cible dans ces deux conditions. La cible reconnue par Apta-F8 semble être exprimée à la fois lors de l'infection de cellules vertébrées et invertébrées par *A. phagocytophilum*. Au contraire, aucun marquage n'a été observé pour Apta-F4 et Apta-F10 dans les cellules de tiques infectées. Leurs cibles sont donc spécifiques aux cellules vertébrées infectées, tout au moins aux cellules HL-60 NY18.

Ces expériences nous ont fourni des pistes quant aux cibles potentielles des aptamères sélectionnés (**Tableau 5**). La prochaine étape est donc de les identifier, de déterminer s'il s'agit de protéines connues ou inconnues et d'explorer leur rôle dans l'infection cellulaire par *A. phagocytophilum*, dans des modèles vertébrés et/ou invertébrés.

Tableau 5 Résumé des résultats de marquage des aptamères sous différentes conditions et observés par microscopie confocale.

	Lysats cellulaires		Cellules vertébrées			Cellules invertébrées			Cibles potentielles
	HL-60	HL-60 NY18	HL-60	HL-60 NY18	HL-60 NY18 prétraitées à la trypsine	ISE6	ISE6 NY18	ISE6 NV2Os	
Apta-F4	Non	Oui	Non	Oui, après 24h d'infection Majorité de formes RC	Non	Non	Non	Non	Protéines à la surface des formes RC ou protéines cellulaires/bactériennes exprimées lors de l'infection
Apta-F8	Non	Oui	Non	Oui, après 12h d'infection Présence de formes DC et RC	Non	Non	Oui	Oui	Protéines à la surface des formes DC ou RC ou protéines cellulaires/bactériennes exprimées lors de l'infection
Apta-F10	Non	Oui	Non	Oui, à 12h et 72h d'infection Majorité de formes DC	Non	Non	Non	Non	Protéines à la surface des formes DC ou protéines cellulaires/bactériennes exprimées lors de l'infection

Pour conclure, une méthode SELEX personnalisée a été utilisée pour sélectionner des aptamères contre une suspension enrichie en *A. phagocytophilum*, contenant des formes DC/RC et des molécules bactériennes et cellulaires. Les résultats du séquençage NGS ont permis de sélectionner trois séquences, caractérisées par un enrichissement rapide et spécifique et par une forte affinité pour les cellules HL-60 NY18. Les cibles de ces aptamères sont très probablement des protéines exprimées à différents temps de l'infection. Apta-F4 et Apta-F10 sont spécifiques vis-à-vis des cellules HL-60 NY18 et potentiellement des modèles d'infection de cellules vertébrées par *A. phagocytophilum*, tandis qu'Apta-F8 reconnaît une protéine commune aux modèles d'infection vertébrés et invertébrés. Les aptamères sélectionnés pourraient donc contribuer à améliorer notre compréhension, à l'échelle cellulaire et moléculaire, des interactions entre la bactérie et ses différents hôtes vertébrés et invertébrés, et permettre le développement de nouvelles méthodes diagnostiques ou thérapeutiques avec par exemple, la délivrance ciblée grâce aux aptamères, de médicaments aux cellules infectées seulement.

III. Résultats préliminaires des essais portant sur des applications futures des aptamères sélectionnés

III.A. Introduction et objectifs

Le travail présenté ouvre donc de nouvelles pistes dans le domaine de la recherche sur *A. phagocytophilum* ainsi que pour le diagnostic et le traitement de l'anaplasmose granulocytaire. Des travaux préliminaires ont été réalisés pour tester la faisabilité de trois applications potentielles des aptamères sélectionnés.

Comme mentionné dans l'état de l'art, la plupart des molécules impliquées dans l'infection par *A. phagocytophilum* ne sont pas identifiées et/ou leurs fonctions sont hypothétiques. Les résultats précédemment obtenus ont permis d'émettre certaines hypothèses sur les cibles protéiques reconnues par les aptamères sélectionnés. L'aptamère Apta-F8 semble être spécifique soit d'une protéine de surface des formes DC ou RC, soit de protéines cellulaires/bactériennes secrétées en début d'infection. Apta-F4 semble reconnaître une protéine de surface des formes RC ou des protéines cellulaires/bactériennes secrétées à un stade plus avancé de l'infection. Enfin, la cible protéique d'Apta-F10 semble être soit localisée à la surface des formes DC soit secrétée par la cellule ou la bactérie à la fois en début et en fin d'infection. L'identification de ces cibles protéiques est donc une réelle opportunité pour découvrir de nouvelles molécules d'intérêt impliquées dans l'infection par *A. phagocytophilum*. Dans cette optique, les aptamères peuvent être utilisés comme outils de purification de leurs cibles afin de permettre leur identification (Javaherian et al., 2009). Nous avons donc réalisé un premier essai d'identification de la cible des aptamères sélectionnés.

Les aptamères peuvent agir comme antagonistes de leur cible, en inhibant la fonction de la protéine ou au contraire par une action agoniste, en favorisant cette fonction (Keefe et al., 2010). Dans notre étude, les cibles protéiques reconnues par nos aptamères sont exprimées à différents temps au cours de l'infection et semblent donc posséder des fonctions différentes. Ces fonctions peuvent être essentielles ou non à l'infection par *A. phagocytophilum*. L'inhibition de l'activité de ces protéines pourrait conduire à une éventuelle réduction de l'infection des cellules par *A. phagocytophilum*. Afin d'étudier l'effet potentiel des aptamères sur l'infection par *A. phagocytophilum*, des tests antibactériens préliminaires ont été réalisés *in vitro*.

Enfin, les méthodes de diagnostic/dépistage actuelles de l'infection par *A. phagocytophilum* souffrent d'un manque de sensibilité, en raison de la faible charge bactérienne présente dans

le sang. Les aptamères spécifiques de protéines de surface d'*A. phagocytophilum* peuvent être utilisés pour développer une méthode de capture de la bactérie au sein d'échantillons sanguins à des fins de diagnostic/dépistage. La mise au point d'une méthode de capture de la bactérie permettrait de concentrer les bactéries pour augmenter la charge bactérienne et aiderait donc à améliorer la sensibilité des méthodes actuelles. De nombreuses optimisations sont nécessaires pour atteindre un tel objectif. Des premiers essais ont été réalisés pour tenter de capturer des bactéries *in vitro* à partir de cellules infectées par *A. phagocytophilum*.

III.B. Matériel et méthodes

III.B.1. Cellules et purification d'*A. phagocytophilum*

Les cellules utilisées pour ces essais sont les cellules HL-60 NY18 d'*A. phagocytophilum*, comme décrit précédemment. Pour certaines expériences, les formes infectieuses (DC) et les formes répliquatives (RC) d'*A. phagocytophilum* ont été purifiées à partir des cellules HL-60 NY18 en utilisant la lyse mécanique par l'homogénéisateur de Dounce, suivant le protocole décrit dans le chapitre 1.II.

III.B.2. Purification des cibles

Un premier essai de purification de la cible a été réalisé à partir d'une suspension enrichie en *A. phagocytophilum*. Le protocole testé a été adapté sous l'hypothèse que les cibles des aptamères sont des protéines présentes à la surface d'*A. phagocytophilum* (**Figure 24**). Pour chaque essai, cinq conditions différentes ont été testées : témoin sans aptamère (PBS avec compétiteurs), séquence scramble, Apta-F4, Apta-F8 ou Apta-F10. Ces essais ont suivi le protocole de Quang *et al.* avec les modifications suivantes (Quang *et al.*, 2017).

Tout d'abord, les aptamères biotinylés ont été dilués à une concentration finale de 50 nM dans une solution de PBS supplémentée en CaCl₂ et MgCl₂ (0,9 mM CaCl₂, 0,49 mM MgCl₂, 2,6 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 8,05 mM Na₂HPO₄, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis), et avec 1 mg/mL d'albumine sérique bovine (BSA) (Merck, Darmstadt, Allemagne), 0,1 mg/mL d'ADN de sperme de saumon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) et 5 mg/mL d'ARNt (Merck, Darmstadt, Allemagne).

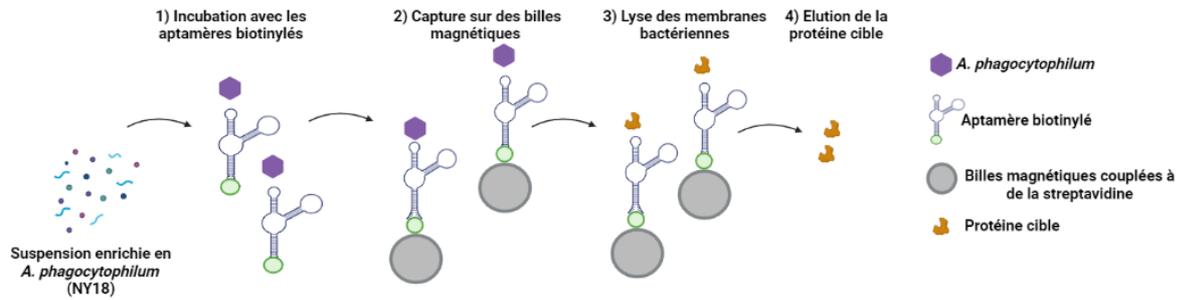


Figure 24 Principe de la méthode de purification des cibles reconnues par les aptamères, dans le cas où la cible est une protéine de surface d'*A. phagocytophilum*.

A. phagocytophilum a été purifiée par lyse mécanique des cellules avec l'homogénéisateur de Dounce, en partant de 20 millions de cellules HL-60 NY18, infectées à plus de 70% pour chaque condition. La suspension obtenue a été incubée avec 100 μ L d'aptamères biotinylés (50 nM) ou 100 μ L de PBS avec compétiteurs (témoin) pendant 30 min à 23°C sous agitation à 650 rpm. Après incubation, quatre étapes de lavage ont été réalisées avec 500 μ L de PBS supplémentés en CaCl₂ et MgCl₂ et par centrifugation à 10 000 g pendant 3 min. Le culot final a été repris dans 100 μ L de PBS supplémentés en CaCl₂ et MgCl₂ avec 1% de BSA.

Pour chaque condition, des billes magnétiques couplées à de la streptavidine (Dynabeads M-280™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) sous un volume de 30 μ L ont été préalablement lavées trois fois avec 100 μ L de PBS et 1% de BSA, après leur incubation sur un portoir aimanté pendant 3 min. Les billes préparées ont ensuite été incubées avec le complexe aptamère-cible pendant 15 min à 23°C sous agitation à 850 rpm. A cette étape, les aptamères biotinylés se fixent aux billes magnétiques, par l'interaction entre la biotine et la streptavidine. Après incubation, deux étapes de lavage ont été réalisées avec 100 μ L de PBS supplémenté en CaCl₂ et MgCl₂. Pour rompre les membranes d'*A. phagocytophilum*, le complexe billes-aptamères-cibles a été incubé avec 1 mL de tampon de lyse, pendant 30 min à 4°C. Le tampon de lyse se compose de PBS, de 0,1% de Triton-X-100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis), de 100 μ L d'inhibiteurs de protéases (Merck, Darmstadt, Allemagne), et de 0,1 mg/mL de compétiteurs (BSA, ARNt et ADN de sperme de saumon). Après la lyse, les billes ont été lavées deux fois avec 100 μ L de tampon de lyse sans compétiteurs. La liaison aptamère-cible a ensuite été rompue par un traitement avec 30 μ L d'urée (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) à 8 M, pendant 15 min à 60°C. Après l'incubation sur un portoir aimanté, le surnageant contenant les cibles protéiques des aptamères a été conservé à -20°C.

Les protéines extraites ont ensuite été reprises dans du tampon 4X Laemli Buffer (Bio-rad, Hercules, Etats-Unis) et dénaturées à 95°C pendant 10 min avant d'être déposées sur un gel

SDS PAGE précoulé (4 à 15%, Bio-rad, Hercules, Etats-Unis) avec un marqueur de taille (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis). Après électrophorèse pendant 2h à 120V, les bandes protéiques ont été révélées au bleu de Coomassie (Bio-rad, Hercules, Etats-Unis). Les profils de migration obtenus ont été comparés par rapport au témoin sans aptamères (PBS avec compétiteurs) et au scramble.

III.B.3. Tests de l'activité antibactérienne *in vitro* des aptamères

L'activité antibactérienne des aptamères Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10 a été testée *in vitro* en utilisant le scramble comme témoin. Tout d'abord, *A. phagocytophilum* a été purifiée par l'homogénéiseur de Dounce à partir de 20 millions de cellules HL-60 NY18, infectées à plus de 70%. Les aptamères biotinylés ont été dilués à une concentration finale de 1 μ M dans une solution de PBS supplémentée en CaCl_2 et MgCl_2 et compétiteurs (5 mg/mL d'ARNt, 1 mg/mL de BSA et 0,1 mg/mL d'ADN de sperme de saumon). Chaque aptamère a été incubé avec la suspension enrichie en *A. phagocytophilum* pendant 30 min à 23°C sous agitation à 650 rpm. Quatre étapes de lavage ont ensuite été réalisées avec 500 μ L de PBS supplémenté en CaCl_2 et MgCl_2 , par centrifugation à 10 000 g pendant 3 min. Le culot final a été repris dans 200 μ L de PBS supplémentée en CaCl_2 et MgCl_2 . Ce culot correspond à la suspension enrichie en *A. phagocytophilum* prétraitée avec les aptamères et a été utilisée pour réinfecter une nouvelle flasque (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis) de cellules saines HL-60 à 2.10^5 cellules/mL.

A 24h, 48h et 72h post-infection, le pourcentage de cellules infectées a été estimé par observation microscopique. Cent microlitres de suspension cellulaire ont été cyto-centrifugés (Shandon Cytospin®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) et colorés avec le kit Hémacolor® (Merck, Darmstadt, Allemagne) pour l'examen microscopique. Le pourcentage de cellules infectées a été estimé en comptant le nombre de cellules infectées sur le nombre de cellules HL-60 totales. Au total, trois champs ont été comptés.

L'infection a également été suivie par PCR quantitative. Après 24h, 48h et 72h d'infection, 1 mL de suspension cellulaire a été récupéré et centrifugé à 11 000 g pendant 10 min. Les extractions d'ADN ont ensuite été réalisées avec le kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Hoerd, France), en suivant les instructions du fabricant. L'ADN a été élué dans 100 μ L de tampon d'éluion préchauffé à 70°C. Pour chaque échantillon, une PCR quantitative ciblant le gène *msp2*, spécifique d'*A. phagocytophilum* (Courtney et al., 2004) et le gène codant pour l'actine β a été effectuée (Jung et al., 2018). Les mix PCR se composaient de 2 μ L d'ADN extrait, de tampon 1X LightCycler® TaqMan® Master mix (Roche, Bâle, Suisse), de 0,20 μ M d'amorces sens et antisens et de 0,20 μ M de la sonde complémentaire, dans un volume final de 12 μ L (**Tableau 6**).

Tableau 6 Amorces et sondes utilisées pour la PCR Taqman®

	Amorce sens	Amorce anti-sens	Sondes
Gène <i>msp2</i> Aph	ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT	TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA	TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG
Gène <i>actine β</i> humaine	ACC CTG AAG TAC CCC ATCG	ATC TTC TCG CGG TTG GCCT	AGC ACG GCA TCG TCA CCA ACT GGG

Le programme PCR consistait en une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie de 40 cycles d'amplification à 95°C pendant 10 s et 60°C pendant 15 s et complétés par 1 cycle final à 40°C pendant 10 s. Des extraits d'ADN d'HL-60 NY18 et de l'eau ont été utilisés comme témoins positif et négatif respectivement. Chaque échantillon a été amplifié en duplicat. Les résultats ont été analysés avec le logiciel LightCycler 480 ® (Roche, Bâle, Suisse).

III.B.4. Méthode de capture d'*A. phagocytophilum* *in vitro*

Trois différentes concentrations de chaque aptamère ont été testées pour le développement de la méthode de capture *in vitro* (**Figure 25**). Chaque essai comportait les conditions suivantes : témoin avant capture, témoin sans aptamère (PBS avec compétiteurs), scramble, Apta-F4, Apta-F8 ou Apta-F10.

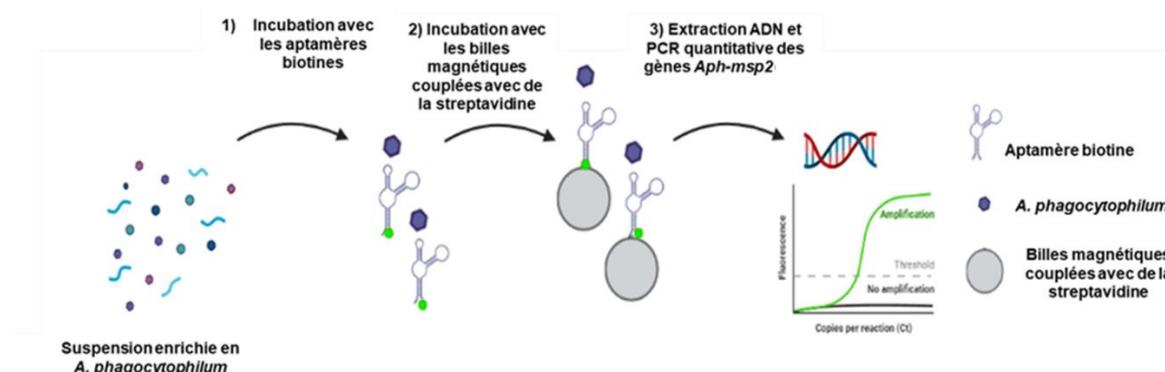


Figure 25 Principe de la méthode capture d'*A. phagocytophilum* à partir d'un lysat de cellules HL-60 NY18.

Tout d'abord, les aptamères biotinylés ont été préparés à différentes concentrations : 2 µM, 1 µM ou 500 nM, dans du PBS supplémenté en CaCl₂ et MgCl₂ avec compétiteurs (5 mg/mL d'ARNt, 1 mg/mL de BSA et 0,1 mg/mL d'ADN de sperme de saumon). Pour chaque condition, 10⁴ cellules HL-60 NY18 ont été purifiées par l'homogénéisateur de Dounce. Deux cents microlitres de cette suspension, qui correspond au témoin avant la méthode capture, ont été conservés pour une future extraction d'ADN. La suspension bactérienne enrichie a été incubée avec 100 µL d'aptamères biotinylés aux différentes concentrations ou 100 µL de PBS avec compétiteurs (témoin) pendant 30 min à 23°C sous agitation à 650 rpm. Deux lavages ont ensuite été réalisés avec 100 µL de PBS supplémenté en CaCl₂ et MgCl₂ après centrifugation

à 10 000g pendant 10 min. Après les lavages, le culot a été repris dans 100 µL de PBS et 2% de BSA. Des billes magnétiques couplées à de la streptavidine (Dynabeads M-280™) sous un volume de 30 µL ont été préalablement lavées trois fois avec 100 µL de PBS supplémenté en CaCl₂ et MgCl₂ et 2% de BSA. Ces billes ont ensuite été incubées avec le complexe aptamère-cible pendant 30 min à 23°C sous agitation à 800 rpm. Après incubation, quatre lavages ont été réalisés avec 100 µL de PBS supplémenté en CaCl₂ et MgCl₂ et 2% de BSA. Le complexe billes-aptamères-cibles a ensuite été repris dans 200 µL de PBS. L'ADN de ce complexe a été extrait avec le kit NucleoSpin Genomic Tissue (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant. L'ADN extrait a été élué dans 30 µL de tampon d'éluion préalablement chauffé à 70°C. Une PCR quantitative *Aph-msp2* a ensuite été réalisée pour chaque échantillon, selon le protocole mentionné ci-dessus. Des extraits d'ADN de culture d'HL-60 NY18 et de l'eau ont été utilisés comme témoins positif et négatif respectivement. Chaque échantillon a été amplifié en duplicat. Les résultats ont été analysés avec le logiciel LightCycler 480 ®.

III.C. Résultats

III.C.1. Purification des cibles

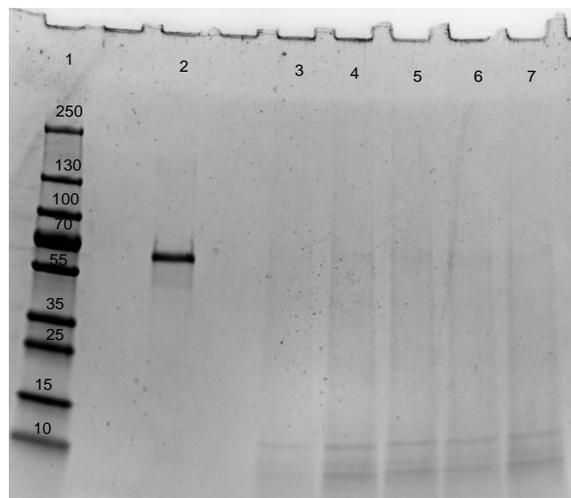


Figure 26 Migration des protéines extraites sur gel SDS-PAGE après coloration au Bleu de Coomassie. 1 : marqueur de taille, 2 : BSA, 3 : protéines extraites avec des billes sans aptamère (témoin PBS), 4 : protéines extraites avec le scramble, 5 : protéines extraites avec Apta-F4, 6 : protéines extraites avec Apta-F8, 7 : protéines extraites avec Apta-F10.

Le protocole de purification a consisté à capturer les aptamères biotinylés liés à leur cible sur des billes magnétiques couplées avec de la streptavidine. Après cette capture, une étape de lyse a été réalisée pour rompre les membranes d'*A. phagocytophilum* et pour extraire la

cible. Cette cible a finalement été éluée des billes par traitement à l'urée, puis déposée sur gel SDS PAGE.

La **Figure 26** représente le profil de migration obtenu pour les différentes conditions. Très peu de protéines ont pu être extraites par le protocole de purification testé. De plus, les profils de migration sont identiques pour l'ensemble des conditions. Les bandes protéiques présentes sont donc liées à des interactions non spécifiques. Ce premier essai n'a donc pas permis de purifier les cibles reconnues par les aptamères.

III.C.2. Tests de l'activité antibactérienne des aptamères *in vitro*

L'activité antibactérienne des aptamères a été testée *in vitro*, en infectant des cellules saines HL-60 avec une suspension purifiée en *A. phagocytophilum* prétraitée avec les aptamères, à une concentration de 1 μ M.

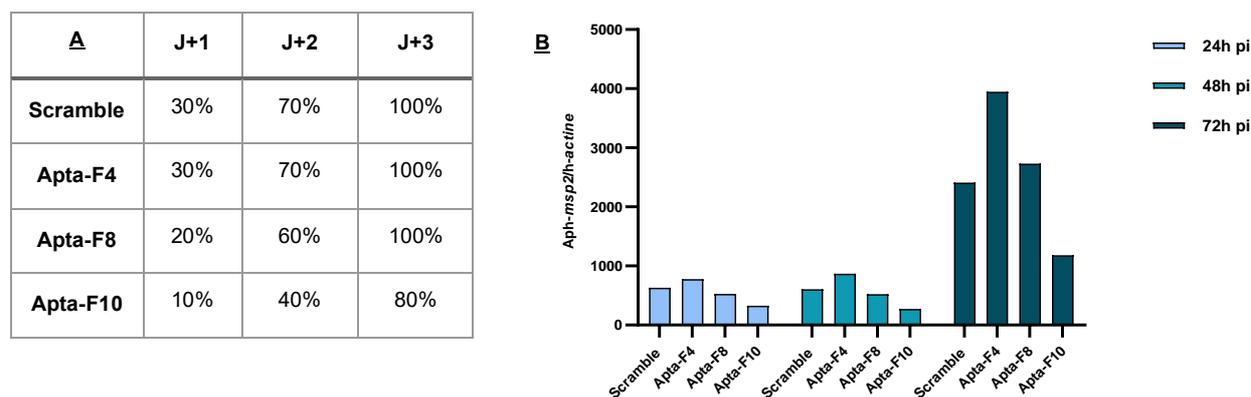


Figure 27 A. Estimation du pourcentage de cellules infectées par *A. phagocytophilum* (HL-60 NY18) par observation microscopique après cyto-centrifugation et coloration Hémacolor®. B: Représentation du ratio normalisé du gène *msp2* au cours de l'infection.

Le pourcentage de cellules infectées a été estimé par observation au microscope après cyto-centrifugation et coloration des cellules avec le kit Hémacolor® (**Figure 27**). Des différences de pourcentage d'infection ont pu être observées entre le scramble et les séquences Apta-F8 et Apta-F10. Le pourcentage de cellules infectées estimé était plus faible pour ces conditions que pour le scramble, après 24h et 48h d'infection. Après 72h d'infection, seule une différence d'infection entre le scramble et Apta-F10 a été observée. Cette méthode microscopique reste peu précise et peu sensible puisqu'elle dépend de l'expérience de l'expérimentateur. Le pourcentage de cellules infectées a été estimé en comptant seulement trois champs, ce qui n'est pas représentatif de la totalité des cellules. Une analyse de quantification relative a été effectuée par PCR quantitative au cours de l'infection, pour obtenir des résultats plus robustes. Le gène codant pour l'actine β a été utilisé comme contrôle interne

de l'ADN cellulaire et a permis de normaliser l'expression du gène *msp2*. Le ratio normalisé a été calculé par le logiciel LightCycler 480® par la formule suivante :

$$\text{Ratio normalisé} = 2^{-\text{Ct cible}} / 2^{-\text{Ct ref}}$$

Le niveau d'expression du gène *Aph-msp2* des cellules incubées avec Apta-F8 était comparable à celui des cellules traitées avec le scramble. Ce niveau d'expression était plus élevé pour les cellules traitées avec Apta-F4 après 48h d'infection, comparées aux cellules traitées avec le scramble. Après 24h, 48h et 72h d'infection, le niveau d'expression du gène *Aph-msp2* a été très réduit pour Apta-F10, comparé au scramble. Ainsi, le pré-traitement avec Apta-F10 a réduit considérablement l'infection par *A. phagocytophilum*. Ce premier résultat suggère que cet aptamère possède un effet inhibiteur de l'infection de cellules HL-60 par *A. phagocytophilum*. Cette expérience doit être répétée afin de confirmer ces résultats.

III.C.3. Méthode de capture d'*A. phagocytophilum* in vitro

La méthode de capture de la bactérie *in vitro* à partir de cellules HL-60 NY18, a consisté à incuber une suspension enrichie en *A. phagocytophilum* avec les aptamères biotinylés qui ont par la suite été capturés sur des billes magnétiques couplées à de la streptavidine. Après quatre étapes de lavage, le complexe billes-aptamères-cibles a été utilisé pour extraire l'ADN et amplifier le gène *msp2* par PCR quantitative. Trois concentrations ont été testées pour chaque aptamère : 2 µM, 1 µM et 500 nM.

Nous avons d'abord comparé les valeurs de Ct obtenues avant et après capture (**Figure 28**). Le Ct obtenu avant capture, correspondant à 10⁴ cellules infectées et purifiées était de 17,4 +/- 0,2. Après capture, une perte conséquente d'*A. phagocytophilum* a été observée pour l'ensemble des conditions et a été estimée à environ 10 Ct, soit un Ct d'environ 27,4.

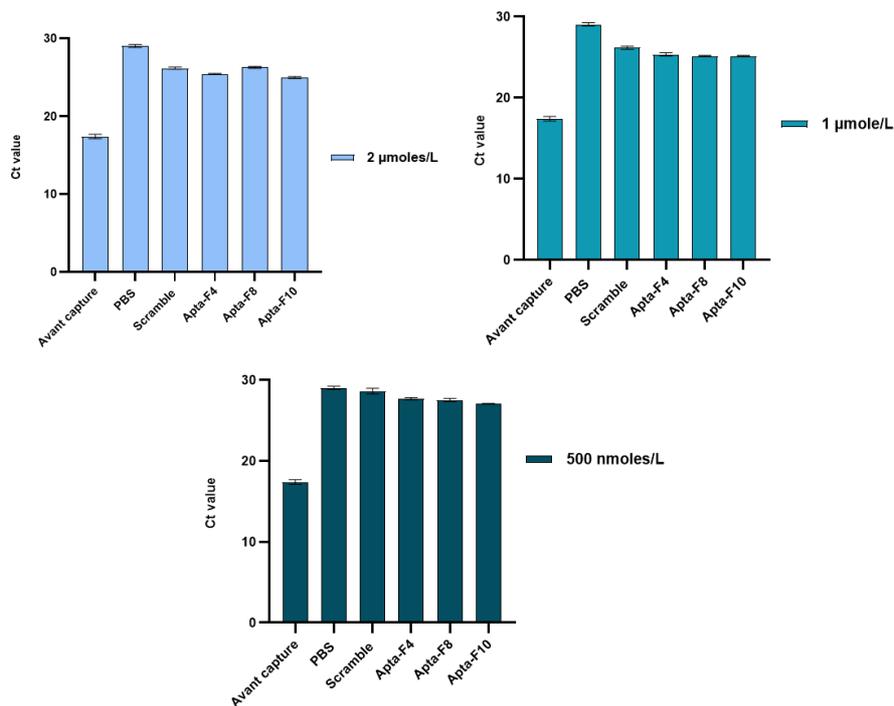


Figure 28 Représentation des valeurs moyennes de Ct obtenues pour le gène *Aph-msp2* après capture sur billes magnétiques couplées à de la streptavidine selon trois concentrations d'aptamères : 2 μM, 1 μM et 500 nM.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé les valeurs de Ct obtenues après capture avec les billes seules (témoin PBS) *versus* chacun des aptamères fixé sur les billes (**Figure 28**). Pour une concentration de 500 nM d'aptamère, les Ct obtenus après capture avec les billes seules (témoin PBS) *versus* les aptamères fixés sur les billes se sont avérés très proches, avec par exemple, une différence de 2 Ct entre le témoin PBS et Apta-F10. Ce résultat indique donc la présence d'interactions non spécifiques entre les billes magnétiques couplées à de la streptavidine et la suspension bactérienne enrichie. L'augmentation de la concentration en aptamères semble réduire ces interactions puisqu'une plus grande différence est observée après capture avec les billes seules (témoin PBS) *versus* les aptamères fixés aux billes, avec par exemple, une différence de 4 Ct entre le témoin PBS et Apta-F4 à 2 μM.

Dans un troisième temps, nous avons comparé les valeurs de Ct obtenues après la capture avec le scramble *versus* chacun des aptamères (**Figure 28**). Pour l'ensemble des conditions, peu de différences ont été mises en évidence entre les aptamères et le scramble. A la concentration de 500 nM, la différence maximale a été observée entre le scramble et Apta-F10, mais elle n'était que de 1,6 Ct. A la concentration de 1 μM, la différence la moins faible a été observée entre le scramble et Apta-F10, mais elle était inférieure à 1 Ct. Enfin, à la concentration de 2 μM, Apta-F10 a permis, de capturer le plus de bactéries avec cependant une différence de 1 Ct avec le scramble. Ces différences restent très faibles et sont non significatives. Le protocole de capture mis en place ne semble donc pas efficace, au moins à

ce stade de sa mise au point, pour utiliser les aptamères comme méthode de capture d'*A. phagocytophilum in vitro*.

III.D. Discussion et conclusion

Actuellement, la majorité des cibles reconnues par des aptamères sélectionnés contre des cellules eucaryotes et procaryotes restent encore inconnues et non identifiées (Drabik et al., 2018). Cette limite peut s'expliquer par la difficulté à extraire sélectivement les cibles reconnues par les aptamères. La méthode électrophorétique suivie d'une identification par spectrométrie de masse est la plus communément utilisée (Drabik et al., 2018). Cependant, le premier essai réalisé à partir d'une suspension enrichie d'*A. phagocytophilum* n'a pas été concluant. Plusieurs voies d'optimisation peuvent être identifiées.

Tout d'abord, le protocole testé a été mis en place en partant de l'hypothèse que les aptamères reconnaissent des protéines de surface d'*A. phagocytophilum*. En effet, l'étape de lyse réalisée permet de rompre la membrane bactérienne et donc de récupérer les protéines de surface. Cependant, les protéines bactériennes ou cellulaires secrétées durant l'infection sont potentiellement aussi des cibles de nos aptamères. Comme notre essai n'a pas été concluant, il serait nécessaire d'une part de répéter l'essai et d'autre part, de réaliser le protocole sans lyse membranaire, puisque celle-ci comporte des étapes susceptibles d'éliminer des cibles potentielles correspondant à des protéines secrétées.

Le protocole a été réalisé selon les mêmes conditions que celles testées précédemment en microscopie confocale, c'est-à-dire en utilisant 50 nM d'aptamères, soit 5 pmoles. Augmenter la quantité initiale de cellules infectées et la quantité d'aptamères est une voie d'optimisation pour extraire une plus grande quantité de protéines. Par comparaison, Quang *et al.* recommandent d'utiliser une concentration d'aptamères 10 fois supérieure au K_d pour saturer la cible (Quang et al., 2017). Une faible quantité de billes magnétiques couplées avec de la streptavidine peut également limiter la capture des aptamères biotinylés liés à leur cible. Dans notre protocole, cette quantité de billes a été choisie en suivant les instructions du fabricant. Augmenter la quantité de billes est aussi une piste à tester pour améliorer la capture. Le nombre de lavages a également son importance. Des étapes de lavages trop intenses et/ou trop nombreux peuvent conduire à la perte de la cible (Quang et al., 2017). Cependant, dans notre cas, seuls deux lavages ont été réalisés avant et après la lyse cellulaire, en suivant les recommandations de la littérature. Réduire le nombre de lavages est donc une possibilité mais risquerait également d'augmenter les interactions non spécifiques (Quang et al., 2017). La composition du tampon de lyse utilisé peut entraîner la rupture de la liaison entre l'aptamère

et sa cible. Cependant, le Triton-X-100 est un agent de surface non ionique, considéré comme un détergent doux et a été utilisé dans notre cas à une faible concentration. Ce détergent est fréquemment utilisé dans les protocoles de purification des cibles, son utilisation ne semble donc pas impacter la liaison aptamère-cible (Quang et al., 2017). L'étape d'élution de la cible est également importante. Plusieurs méthodes peuvent être testées, comme une température élevée, un traitement avec une forte concentration en sels, des variations de pH... (Lönne et al., 2015). Notre choix s'est porté sur un traitement à l'urée à 8 M, comme retrouvé dans la littérature (Quang et al., 2017). Il serait intéressant pour les futures expériences de conserver la partie non éluée pour un dépôt sur gel, afin de vérifier l'efficacité de cette étape d'élution. Enfin, le bleu de Coomassie est un colorant très utilisé mais cette coloration est peu sensible par rapport à la coloration argentique, considérée comme très sensible pour la détection de protéines (Sasse and Gallagher, 2009). Son utilisation permettrait donc une meilleure visualisation des bandes protéiques. Ces différents points sont des voies d'optimisation nécessaires dans la perspective de l'utilisation des aptamères comme outils de capture.

Quelques études ont pu démontrer le potentiel rôle antibactérien des aptamères. Un aptamère à ARN a été sélectionné contre une protéine structurale de *Salmonella* Typhi et a permis de réduire de 71% l'invasion des bactéries dans les monocytes humaines (Pan et al., 2005). Afin d'étudier le potentiel effet antibactérien des aptamères sélectionnés, un premier essai *in vitro* a été réalisé, selon le protocole de Pan *et al.*, avec une concentration en aptamères de 1 μ M (Pan et al., 2005). Pour Apta-F4, aucune réduction de l'infection par *A. phagocytophilum* n'a été observée dans les cellules HL-60. Au contraire, cette infection semble être plus importante pour les cellules incubées avec Apta-F4 qu'avec le scramble, après 48h d'infection. Nous pouvons tenter de corrélérer ces résultats avec l'étude de cinétique réalisée précédemment. Cet aptamère reconnaissait sa cible après 24h d'infection, ce qui correspond à l'étape de réplication intracellulaire des formes RC dans les cellules HL-60. En corrélant ces deux résultats, une hypothèse peut donc être émise. Apta-F4 semble agir comme un agoniste de sa cible, en favorisant sa fonction protéique et donc la réplication d'*A. phagocytophilum*. Cette hypothèse expliquerait l'augmentation de l'infection observée à 48h post-infection. Apta-F8 ne semble pas avoir d'effet sur l'infection par *A. phagocytophilum* des cellules HL-60, selon les résultats de PCR quantitative. Par observation microscopique, une réduction a été observée, mais il s'agit d'une méthode moins sensible et moins précise que la PCR quantitative (Brouqui et al., 2004). Deux hypothèses peuvent être émises. La cible de cet aptamère peut ne pas jouer un rôle essentiel dans l'infection par *A. phagocytophilum* et dans ce cas, l'inhibition/l'augmentation de son activité protéique par Apta-F8 n'a pas d'impact sur l'infection. La seconde hypothèse qui peut être émise est que cet aptamère reconnaît sa cible sur une structure de la protéine qui n'est pas nécessaire à sa fonction. De ce fait, Apta-F8 n'agit ni

comme agoniste ni comme antagoniste de sa cible. Enfin, pour Apta-F10, une réduction importante de l'infection par *A. phagocytophilum* a été observée dans les cellules HL-60, dès 24h post-infection. L'étude de cinétique réalisée précédemment a montré que la cible protéique d'Apta-F10 était exprimée à 12h et 72h post-infection, correspondant à l'étape d'invasion cellulaire par les formes DC. Sur cette base, une hypothèse peut être émise pour expliquer cette réduction. Apta-F10 semble agir comme un antagoniste de sa cible, en inhibant sa fonction protéique et donc l'invasion cellulaire par *A. phagocytophilum*, réduisant ainsi considérablement le niveau d'infection des cellules HL-60. Ce résultat est prometteur pour l'utilisation de cet aptamère en tant que molécule thérapeutique, puisque le traitement par Apta-F10 a été efficace même après 72h post-infection, ce qui est rarement le cas pour un antibiotique après une seule administration. Cependant, cette expérience doit impérativement être répétée pour s'assurer de la fiabilité de ce premier résultat (n=3). Il serait également intéressant de tester l'effet de concentrations d'aptamères plus importantes telles que 2 μM ou 5 μM , sur l'infection par *A. phagocytophilum* (Yu et al., 2021; Zou et al., 2021).

Enfin, plusieurs études ont utilisé des aptamères dans le cadre du diagnostic de maladies infectieuses ou de la détection d'agents pathogènes, pour concentrer et détecter des bactéries spécifiques au sein de matrices complexes (échantillons sanguins, environnement, produits alimentaires,...) (Singh et al., 2012; Lamont et al., 2014). Suh *et al.* ont réussi à capturer *Campylobacter jejuni* à partir d'une culture bactérienne mixte composée d'autres bactéries transmises par les aliments (*Salmonella* Enteritidis, *Shigella sonnei*, et *Escherichia coli* O157:H7). Cette méthode de capture se composait d'un aptamère spécifique de *Campylobacter jejuni* immobilisé sur des billes magnétiques couplées à de la streptavidine (Suh et al., 2014). Nous avons émis l'hypothèse que les aptamères sélectionnés reconnaissent des protéines de surface d'*A. phagocytophilum*. Sous cette hypothèse, un premier test de capture d'*A. phagocytophilum* *in vitro* à partir d'un lysat de cellules infectées a été réalisé. Des billes magnétiques couplées avec de la streptavidine ont été utilisées comme support des aptamères biotinylés et ont été couplées à une PCR quantitative du gène *msp2* pour détecter et quantifier *A. phagocytophilum*. Trois concentrations de chaque aptamère ont été testées : 500 nM, 1 μM et 2 μM . Cependant, les premiers résultats n'ont pas été concluants, puisque les aptamères n'ont pas permis de capturer significativement plus de bactéries, comparés au scramble et au témoin PBS. De plus, une réduction importante de bactéries avant et après capture a été observée. Plusieurs voies d'optimisation peuvent être envisagées. Augmenter la quantité de billes magnétiques couplées avec de la streptavidine est une voie possible pour améliorer la capture des aptamères biotinylés (Suh et al., 2014). Les conditions appliquées lors des étapes de lavage peuvent avoir été trop stringentes (4 lavages avec PBS et 2% BSA). Réduire le nombre de lavages et éliminer la BSA pourrait éviter

de perdre du matériel biologique. Enfin, il serait intéressant de tester plusieurs concentrations de cellules HL-60 NY18 purifiées afin de réaliser une gamme de quantification (Suh et al., 2014). La quantification d'*A. phagocytophilum* au microscope est particulièrement complexe puisque ces bactéries sont dispersées de manière hétérogène dans les cellules HL-60, qui contiennent un nombre variable de morulae. La quantification de cellules infectées ou de bactéries peut se réaliser par PCR quantitative, en utilisant un plasmide contenant une séquence spécifique d'*A. phagocytophilum* (*msh2*) dont le nombre de copies est connu (Azagi et al., 2022). Cette gamme de quantification servirait donc à déterminer l'efficacité de la méthode capture et aiderait à mieux comparer les résultats (Suh et al., 2014). Il serait également intéressant de conserver les fractions récupérées après les lavages pour réaliser la PCR quantitative du gène *msh2*, afin d'identifier l'étape critique du protocole. Enfin, cette méthode de capture *in vitro* a été testée sous l'hypothèse que les aptamères sélectionnés étaient spécifiques d'*A. phagocytophilum*. Cependant, les protéines bactériennes ou cellulaires secrétées durant l'infection sont également des cibles probables de nos aptamères. Dans le cas où les futurs essais d'optimisation ne donneraient pas de résultats tangibles, l'hypothèse que les aptamères reconnaissent *A. phagocytophilum* pourrait être réfutée. L'identification de leur cible est donc indispensable pour développer ou non la méthode de capture.

Pour conclure, le protocole de purification testé n'a pas encore permis d'éluer les cibles protéiques reconnues par les aptamères. Néanmoins, plusieurs voies d'optimisation du protocole ont pu être proposées. Une fois le protocole optimisé, les protéines pourront être identifiées par spectrométrie de masse. L'identification de ces cibles est nécessaire pour le développement d'une méthode de capture de la bactérie au sein d'échantillons sanguins, qui est une perspective à plus long terme, si les aptamères s'avèrent bien spécifiques d'*A. phagocytophilum* et non de protéines non associées au corps bactérien exprimées durant l'infection. Sous cette hypothèse, la mise en place d'une telle méthode nécessitera par ailleurs de nombreuses études préliminaires, comme notamment l'étude de la stabilité des aptamères dans le sang total humain ou animal... Quant aux premiers essais de l'effet antibactérien des aptamères sélectionnés, ils ont permis d'obtenir des résultats prometteurs pour l'utilisation d'Apta-F10 en tant que molécule thérapeutique. Cependant, cette expérience nécessite d'être répétée pour confirmer ces premiers résultats. Cette dernière partie confirme le potentiel des aptamères pour des applications innovantes et révèle l'ampleur des travaux à réaliser pour mettre en place de telles applications pour les aptamères sélectionnés vis-à-vis d'*A. phagocytophilum* ou de protéines exprimées durant l'infection, à des fins diagnostiques, de dépistage et thérapeutiques.

Chapitre 2 : Sélection d'aptamères contre Asp14, une protéine de surface d'*A. phagocytophilum*

I. Introduction et objectifs

Malgré le développement du Cell-SELEX et de ses variantes, les protéines recombinantes restent des cibles de choix pour la sélection d'aptamères (Dunn et al., 2017). Cette méthode de sélection est moins complexe et plus rapide que le Cell-SELEX (Chen et al., 2016). Plusieurs techniques d'immobilisation de la cible sont possibles et la méthode nécessite en général moins de tours de sélection. Par cette méthode, des aptamères de forte affinité pour une cible protéique connue sont obtenus (Goto et al., 2017). Du fait de ces avantages, nous avons développé une seconde approche pour sélectionner des aptamères spécifiques d'*A. phagocytophilum*, en ciblant une protéine présente à sa surface.

Cependant, même si la majorité des SELEX est actuellement réalisée contre des protéines recombinantes, de plus en plus d'études ont montré que les aptamères sélectionnés contre des protéines membranaires purifiées ne parvenaient pas à reconnaître leur cible exprimée à la surface des cellules (Santana-Viera et al., 2023). La liaison de l'aptamère dépend de la structure de sa cible, qui elle-même dépend au moins partiellement de son environnement. Les structures complexes (domaines transmembranaires), les variations, même mineures, de la séquence en acides aminés de la protéine (par exemple protéines isoformes) ou les modifications post-traductionnelles (comme la glycosylation) peuvent influencer sur le repliement des protéines. Les protéines recombinantes peuvent donc ne pas se replier dans leur conformation naturelle exprimée à la surface cellulaire, ce qui peut constituer un frein à l'utilisation de protéines recombinantes pour la sélection d'aptamère (Catuogno et Esposito, 2017).

Le choix de la protéine cible était donc crucial et a constitué la première étape de ce projet. Il est recommandé de choisir une protéine membranaire avec une structure peu complexe (absence de domaines transmembranaires, absence de modifications post-traductionnelles...) et avec un domaine de liaison extracellulaire, potentiellement accessible aux aptamères. Une veille bibliographique a donc été réalisée pour étudier les protéines de surface d'*A. phagocytophilum*. Seules une dizaine de protéines ont été identifiées dans la littérature dont les plus étudiées sont les protéines MSP2 (P44), MSP4, et les trois invasines, OmpA, Asp14 et AipA.

A. phagocytophilum possède une série de gènes qui codent pour des protéines MSP2 (P44) transmembranaires de 42 à 49 kDa, abondamment présentes à la surface de la bactérie et qui portent des épitopes immunodominants (Sarkar et al., 2008). Ces protéines ont une structure commune consistant en une région hypervariable centrale flanquée de régions N-terminale et C-terminale conservées. Les protéines MSP2 sont impliquées dans la variation antigénique, l'adaptation à l'hôte, l'adhésion et l'activité des porines (Park et al., 2003; Sarkar et al., 2008). Dans une culture de cellules HL-60 infectées, ces protéines expriment de multiples isoformes, tronqués ou non, ainsi que de nombreuses protéines N-glycosylées (Sarkar et al., 2008). En raison de leur structure complexe, ces protéines n'ont pas été choisies comme cible pour sélectionner des aptamères contre *A. phagocytophilum*.

La protéine MSP4 est également une protéine de surface d'*A. phagocytophilum*, qui forme un complexe avec la protéine chaperonne HSP70. Ce complexe protéique permet ensuite l'interaction de la bactérie avec les cellules hôtes vertébrées et invertébrées (Villar et al., 2015; Contreras et al., 2017). La protéine MSP4 est une protéine transmembranaire avec des extrémités N-terminale et C-terminale orientées vers le cytosol et des feuillettes β enfouis dans la membrane bactérienne. Son domaine de liaison est très réduit et se situe au niveau de feuillettes β possédant une conformation en épingle à cheveux et exposés au niveau extracellulaire (Contreras et al., 2017). Ce domaine de liaison semble être difficilement accessible aux aptamères. Par conséquent, cette protéine n'a pas été choisie comme cible.

La capacité des bactéries intracellulaires à coloniser les cellules hôtes eucaryotes dépend des interactions entre les invasives bactériennes et les récepteurs de surface des cellules hôtes. Ces invasives sont des protéines essentielles à l'entrée de la bactérie (Rikihisa, 2011). Trois invasives d'*A. phagocytophilum* sont les plus étudiées à ce jour et semblent fonctionner en synergie pour assurer l'invasion cellulaire (Ojogun et al., 2012; Kahlon et al., 2013; Seidman et al., 2014) :

- Tout d'abord, la protéine OmpA est une glycoprotéine de surface exprimée tout au long du cycle de développement d'*A. phagocytophilum* dans les cellules HL-60 (Ojogun et al., 2012). Elle interagit avec la protéine PSGL-1, exprimée à la surface des granulocytes neutrophiles humains et des cellules HL-60, pour assurer son rôle d'invasine. Sa structure est bien documentée, elle possède un domaine extracellulaire N-terminal et un domaine transmembranaire en forme d'hélice (Ojogun et al., 2012). En raison de sa nature glycoprotéique et de son domaine transmembranaire, nous n'avons pas choisi cette protéine comme cible.
- La protéine AipA est également une invasine importante pour l'infection des cellules hôtes vertébrées, située à la surface des formes DC d'*A. phagocytophilum* (Seidman

et al., 2014). Cette invasine reste peu étudiée, son récepteur est actuellement inconnu. Du fait de ce manque de données et de sa structure impliquant de nombreux domaines transmembranaires, cette protéine n'a pas non plus été choisie comme cible.

- Enfin, la protéine Asp14 est localisée sur la membrane externe des formes DC d'*A. phagocytophilum* (Kahlon et al., 2013). Cette protéine interagit avec la surface des cellules hôtes de vertébrés pour favoriser l'infection. Une étude récente a réussi à identifier un interacteur d'Asp14, correspondant à la protéine disulfure isomérase (PDI), présente à la surface des cellules de mammifères (Green et al., 2020). Cette enzyme interagit avec Asp14 pour réduire les ponts disulfure situés à la surface bactérienne et, par conséquent, pour faciliter l'invasion des cellules par *A. phagocytophilum*. L'association d'Asp14 à la membrane de la bactérie n'implique pas de domaines transmembranaires et son rôle d'invasine est porté par son domaine de liaison C-terminal chargé positivement, comprenant les acides aminés 101 à 124 (Kahlon et al., 2013). En raison de sa structure peu complexe et d'un domaine de liaison C-terminal, la protéine Asp14 répondait à l'ensemble de nos critères de sélection. De plus, à notre connaissance, aucun anticorps monoclonal n'a été développé contre cette protéine.

L'objectif principal de ce volet de mon travail était donc de sélectionner des aptamères contre la protéine Asp14. Une collaboration internationale a été mise en place avec le laboratoire du Pr. Gunter Mayer, situé au LIMES (*Life and Medical Science Institute*) de l'Université de Bonn en Allemagne. Cette équipe de recherche possède une expertise dans le domaine des aptamères et a développé une plateforme robotisée pour sélectionner des aptamères contre des cibles protéiques, en seulement quelques jours. J'ai eu l'opportunité de réaliser un échange de 3 mois dans cette équipe de recherche pour réaliser la sélection d'aptamères contre la protéine recombinante, en utilisant cette plateforme. Les aptamères sélectionnés ont ensuite été analysés par séquençage NGS et leur affinité a été évaluée contre la protéine recombinante, par cytométrie en flux. Enfin, ces aptamères ont été testés contre des cellules HL-60 infectées par la souche NY18 d'*A. phagocytophilum*, par microscopie confocale. Ces résultats sont présentés dans cette partie, sous la forme d'un article, qui sera prochainement soumis dans le journal PLOS ONE.

Article : Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Breuers, S.; Mayer, G. ; Ducongé, F.; Boulouis, H.-J.; Deshuillers, P.L; Lagrée, A.-C.; Haddad, N. **Selection of DNA aptamers against Asp14, a surface protein of *A. phagocytophilum*.**

Selection of DNA aptamers against Asp14, a surface protein of *A. phagocytophilum*

Lisa Lucie Le Dortz¹, Clotilde Rouxel¹, Stefan Breuers², Gunter Mayer², Frédéric Ducongé³, Henri-Jean Boulouis¹, Pierre Lucien Deshuillers¹, Anne-Claire Lagrée¹, Nadia Haddad¹

¹ Anses, INRAe, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, Laboratory of Animal Health, Maisons-Alfort, F-94700, France

² Life and Medical Science Institute, University of Bonn, Gerhard-Domagk-Str. 1, 53121 Bonn, Germany

³ CEA, Fundamental Research Division (DRF), Institute of Biology François Jacob, Molecular Imaging Research Center, CNRS UMR9199, Paris-Saclay University, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

*** Correspondence:**

Nadia Haddad

nadia.haddad@vet-alfort.fr

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*, Asp14, aptamers, automated SELEX

Abstract

Anaplasma phagocytophilum is a strict intracellular and zoonotic bacterium, transmitted by hard ticks. This bacterium is responsible for granulocytic anaplasmosis, with strong impact for human and animal health. However, *A. phagocytophilum* remains particularly difficult to isolate and cultivate, because of its strict intracellular location, its short lifespan in samples and the lack of available permissive cells. In addition, many of the tools that could contribute to its study, such as monoclonal antibodies, are not available to the scientific community. Aptamers are oligonucleotides able to bind with high affinity and specificity to a wide range of targets, notably proteins. Their application to *A. phagocytophilum* seems promising and could help to overcome the methodological difficulties. We identified the protein Asp14 as an interesting target to develop aptamers. This protein is expressed at the surface of infectious forms of *A. phagocytophilum*, which interacts with mammalian host cells to promote the infection. The objective of this study was therefore to select aptamers against the recombinant Asp14 protein, through an automated SELEX. Selection resulted in eight candidate aptamers with high affinity toward the recombinant Asp 14 protein. Six of these sequences appeared to recognize the Asp14

35 protein expressed in the vertebrate infection model (HL-60 cells infected with NY18 strain).
36 Aptamers specific to Asp14 could be an opportunity to develop a capture method of DC forms
37 from field samples and to improve consequently the detection and culture of
38 *A. phagocytophilum*.

39 Introduction

40

41 Granulocytic anaplasmosis is an emerging human and veterinary infection, caused by the strict
42 intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*, transmitted by ticks of the *Ixodes* spp.
43 genus [1]. Human granulocytic anaplasmosis (HGA) is the second most common tick-borne
44 disease in the USA and is also reported in Europe and Asia [2]. The number of HGA cases is
45 steadily increasing in the USA, with more than 35,000 cases reported from 2008 to 2019 [3].
46 In Europe, *A. phagocytophilum* are of major economic importance, particularly in livestock as
47 it causes decreased production, including abortions, drops in milk production in cattle, as well
48 as secondary infections, including pyemia in sheep [4] . Conversely, few cases of human
49 granulocytic anaplasmosis associated with mild symptoms have been reported in Europe, unlike
50 in the USA [5]. However, the incidence of European human cases is probably underestimated,
51 given that the main clinical symptom is a non-specific flu-like syndrome with hyperthermia,
52 malaise, myalgia and migraine [5].

53 Despite its human and animal health impacts, the mechanisms of infection and the interactions
54 between this bacterium and its vertebrate/invertebrate hosts are still poorly understood, which
55 limits the development of therapeutic/diagnosis strategies. This may be explained by the
56 difficulty to cultivate and isolate *A. phagocytophilum*, because of its strict intracellular location,
57 the lack of available permissive cells and its short lifespan in blood samples. In addition,
58 molecular tools to study *A. phagocytophilum*, particularly monoclonal antibodies, are not
59 available for the scientific community.

60 *A. phagocytophilum* preferentially infects the vertebrate host neutrophils through endocytosis
61 and multiplies in a cytoplasmic vacuole [6]. The survival of *A. phagocytophilum* in these host
62 cells can be surprising as neutrophils have a short lifespan, less than 24 hours in the bloodstream
63 and have antibacterial functions [7]. The mechanisms allowing survival of the bacterium within
64 neutrophils are still poorly understood, but involve delayed apoptosis and inhibition of NADPH
65 oxidase activity [8] . In cells, *A. phagocytophilum* exhibits a biphasic developmental cycle,
66 similar to that of *Ehrlichia* spp., *Chlamydia* spp., and *Coxiella burnetii* [9,10]. The infectious

67 dense-cored form (DC form) promotes the invasion and infection of promyelocytic and
68 endothelial cells [6]. Four to 8 hours post-infection, DC forms transition to noninfectious,
69 replicative reticulate cell (RC) forms. RC forms initiate the replication inside the cells, by
70 forming bacterium-containing vacuoles, called morulae. Twenty eight to 32 hours post-
71 infection, DC forms are produced and then released into the environment for a new wave of
72 infection [11]. The ability of intracellular bacteria to colonize eukaryotic host cells depends on
73 interactions between bacterial invasins and host cell receptors. So far, three adhesins have been
74 identified and studied, corresponding to OmpA (outer membrane protein A), AipA
75 (*A. phagocytophilum* invasion protein A) and Asp14 (14-kDa *A. phagocytophilum* surface
76 protein) [12–14].

77 The Asp14 protein is localized on the surface of DC forms of *A. phagocytophilum* [13]. This
78 protein is particularly overexpressed at the beginning (4 h and 8 h post-infection) and at the end
79 of the infectious process (32 h post-infection), when Asp14 is needed for invasion of
80 mammalian cells. This protein interacts with mammalian host cell surfaces, *via* its C-terminal
81 domain to promote the infection. A recent study identified an Asp14 interactor, the protein
82 disulfide isomerase (PDI), present at the surface of the eukaryotic cells [2]. This enzyme
83 interacts with Asp14 to reduce bacterial surface disulfide bonds, thereby facilitating invasion
84 by the pathogen [2]. Through its invasin function, Asp14 is critical for infection and targeting
85 this protein can protect against infection by *A. phagocytophilum*. In a previous study, the
86 incubation of DC forms (*A. phagocytophilum* NCH-1 strain) with a polyclonal antiserum raised
87 against GST-Asp14 reduced the infection by 37 % in HL-60 cells [13]. Another study
88 demonstrated that a polyclonal antiserum produced against the C-terminal domain of Asp14
89 reduced the infection of HL-60 cells *in vitro* by approximately 50 % [15]. Last, an antibody
90 cocktail raised against the invasin domain of the three proteins Asp14, OmpA and AipA
91 impaired the infection by approximately 80 % in HL-60 cells [16].

92 In addition to its therapeutic potential, Asp14 is of great interest for research and diagnosis
93 purposes. More precisely, it is an interesting target for the capture of DC forms from field
94 samples and a great opportunity to improve *A. phagocytophilum* isolation and culture, as well
95 as the sensitivity of detection methods. Until recently, monoclonal antibodies were the most
96 commonly used affinity ligands for pathogen capture [17]. To our knowledge, no monoclonal
97 antibody has been developed against Asp14. The selection of an aptamer directed against Asp14
98 and the recent emergence of aptamer technology in the field of diagnostics would offer new

99 approaches for the detection of *A. phagocytophilum* infection and in research. Similar to
100 antibodies, these oligonucleotides (single-stranded DNA, RNA, chemically modified
101 nucleotides) can bind to their targets with high affinity and specificity [18]. They have
102 advantages over antibodies as they are less expensive, more stable, and can be synthetically
103 manufactured and easily modified. Aptamers have also proved useful in therapeutic and
104 diagnosis applications, and have been used to develop capture methods that are effective against
105 many bacteria such as *Salmonella enterica* or *Staphylococcus aureus* [17,19,20].

106 The aim of this study was to obtain specific aptamers against the Asp14 surface protein and to
107 provide new tools for the culture and purification of *A. phagocytophilum*. For this, aptamers
108 were selected against the recombinant Asp14 protein, by an automated SELEX. After the
109 selection, the binding affinity of selected aptamers was evaluated against the vertebrate
110 infection model (HL-60 cells infected with the American human NY18 strain of
111 *A. phagocytophilum*).

112 **Materials and Methods**

113

114 **Cells**

115

116 The human-derived promyelocytic leukemia cell line HL-60 was purchased from ATCC (CCL-
117 240, Manassas, VA, USA) and maintained in culture in IMDM medium (Thermo Fisher
118 Scientific, Waltham, USA), supplemented with 20 % fetal calf serum (Thermo Fisher Scientific,
119 Waltham, USA), in 75 cm² flasks. The American human NY18 strain of *A. phagocytophilum*
120 [21] was maintained in HL-60 cells (HL-60 NY18), as previously described [22]. One hundred
121 microliters of cells infected at >70 % were added to a new flask of non-infected HL-60 cells at
122 a final concentration of 2.10⁵ cells/mL. The infected cells were then incubated at 37 °C with 5
123 % CO₂. To monitor *A. phagocytophilum* infection, 100 µL of cell suspension were
124 cytocentrifuged (Shandon Cytospin®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and stained
125 with Hemacolor® kit (Merck, Darmstadt, Germany) for microscopic examination.

126

127 **Production of recombinant Asp14 protein and protein function** 128 **assay**

129

130 The recombinant Asp14 protein was produced by Genecust (Boynes, France), according to its
131 amino-acid sequence from *A. phagocytophilum* NCH-1 strain, with N-terminus 6X His tag
132 (WP_011450388) [13]. The sequence was optimized for the *E. coli* expression system and the
133 gene was synthesized in the pet-30a (+) vector. The protein was finally purified with nickel
134 chromatography columns. The size of the protein was confirmed by SDS-PAGE.

135 Immunocytochemistry was performed to confirm the binding of the recombinant protein to HL-
136 60 cells. For this, 10⁵ HL-60 cells were incubated with 4 μM of His-tagged Asp14 at 37 °C for
137 1 h [13]. After incubation, cells were washed with 1 mL of PBS supplemented with 1 % of BSA
138 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), by centrifugation at 500 x g for 10 min. Bound His-
139 tagged Asp14 was detected using a rabbit anti-His tag FITC antibody (11560073, Thermo
140 Fisher Scientific, Waltham, USA). Cells were incubated with 1 μg/mL of the antibody for 30
141 min at 37 °C in the dark. After incubation, cells were washed twice with 1 mL of PBS
142 supplemented with 1 % BSA, by centrifugation at 500 x g for 10 min. The cell pellet was
143 suspended in 200 μL of PBS supplemented with 1 % of BSA and then cytocentrifuged.
144 Microscopic slides were prepared with Prolong Antifade Diamond Mounting medium
145 containing DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and were examined at a 630x
146 magnification on Leica DMI8 microscope. The control was HL-60 cells incubated with the
147 rabbit anti-His tag FITC antibody. This experiment was repeated twice.

148 **Coupling of Asp14 to Dynabeads™ His-tag isolation and pull-down**

149

150 The recombinant protein was immobilized on Dynabeads™ His-Tag isolation and pulldown
151 (Asp14 coupled to the beads), for the automated SELEX [23]. Nine point six nmoles of the
152 recombinant protein were diluted in 1 mL of 1 X coupling buffer (50 mM Na₃P₀₄, pH=8, 300
153 mM of NaCl and 0.01 % of Tween™ 20). One hundred microliters of Dynabeads™ His-Tag
154 isolation and pulldown (4 mg/mL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) were incubated
155 with the recombinant protein for 30 min at 4 °C at 20 rpm. After incubation, two washing steps
156 were performed with 1 mL of 1X coupling buffer. Finally, the beads were resuspended in 1 mL
157 of storage buffer. Two different storage buffers, composed of 1.25 X PBS (pH=7.4), 1 mg/mL
158 BSA, with or without 0.0625 mg/mL heparin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), were
159 used for the automated selection.

160 Before SELEX, the coupling of Asp14 to beads was confirmed. For this, 1.92 nmoles of Asp14
 161 were coupled to 20 μ L of beads (0.8 mg/mL), as described previously. The protein was then
 162 eluted with 100 μ L of buffer (300 mM imidazole, 50 mM Na_3P_0_4 (pH=8), 300 mM NaCl and
 163 0.01 % TweenTM 20) for 5 min at 4 °C. Imidazole at high concentration (300 mM) is able to
 164 bind to the cobalt ion presents on the surface of the beads, leading to the replacement of cobalt-
 165 histidine interactions by cobalt-imidazole interactions. The supernatant, corresponding to the
 166 eluted protein, was recovered after magnet separation. The beads were resuspended with 200
 167 μ L of storage buffer. The washed and the eluted fractions were concentrated with Amicon Filter
 168 10 kDa (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), by centrifugation at 14,000 x g for 15 min at 4 °C
 169 for a final volume of 20 μ L. The samples were then diluted in 4X Laemli Buffer (Bio-rad,
 170 Hercules, USA) and denaturated at 95 °C for 10 min. Fifteen microliters of samples were loaded
 171 on 12.5 % SDS-PAGE. After electrophoresis for 2 h at 120 V, bands were revealed with
 172 Coomassie blue (Bio-rad, Hercules, United States).

173 Automated selections

174

175 Two automated selections were conducted independently, according to the SELEX method
 176 presented in **Figure 1**. D2 DNA library and primers used for the selection were purchased from
 177 Ella Biotech GmbH (Munich, Germany) (**Supplementary Table S1**).

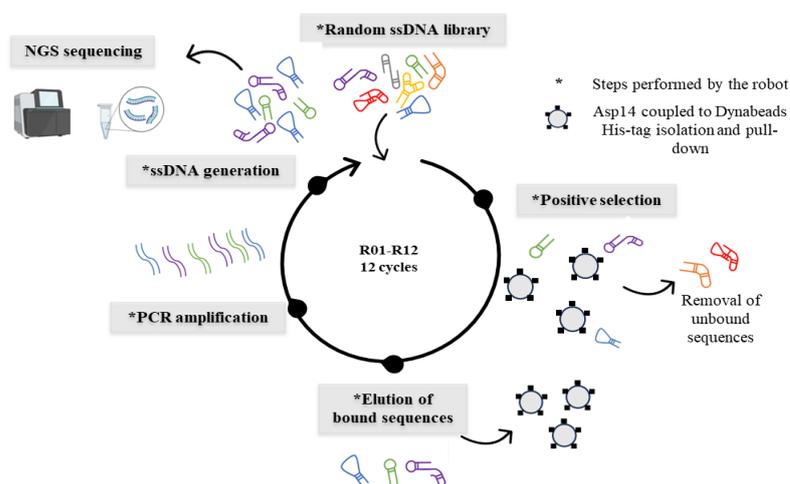


Figure 1 Schematic representation of the automated SELEX applied to select DNA aptamers against the recombinant Asp14 protein.

178

179 The first selection was performed with a binding buffer, composed of 1 X PBS, 3 mM MgCl_2 ,
 180 0.8 mg/mL BSA and 0.05 mg/mL heparin, as competitors. The second selection was conducted

181 without heparin, with a binding buffer composed of 1 X PBS, 3 mM MgCl₂ and 0.8 mg/mL of
182 BSA. First, the recombinant Asp14 was immobilized on beads, as described above (9.6 nmoles
183 with 100 μL of beads). D2 library was prepared at 0.5 nmol in sterile water and 2 mM MgCl₂
184 (Promega, Madison, USA), in a final volume of 20 μL. These parts were done manually.

185 Access to the automated platform was provided by Pr. Gunter Mayer (LIMES, University of
186 Bonn, Germany). The automated selection was then conducted using a Biomek NX^P robot, as
187 described by Breuers and Mayer with some modifications [23]. D2 library was incubated with
188 80 μL of Asp14 coupled to the beads, for 30 min at 37 °C at 700 rpm (Thermo Mixer 1.5,
189 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). After incubation, two washing steps were performed
190 with 100 μL of washing buffer (PBS and 3 mM MgCl₂) for 5 min. The sample was then
191 transferred into the robot thermal cycler and bound sequences were eluted with sterile water at
192 80 °C for 5 min. After magnetic separation, 49 μL of the supernatant were transferred into a
193 PCR reaction tube. For PCR amplification, 1 μL of GoTaq® G2 Flexi DNA polymerase
194 (Promega, Madison, USA) was added to the tube with 50 μL of PCR master mix composed of
195 2 X colorless GoTaq® Flexi Buffer, 2 mM MgCl₂, 1 μM of each primer and 0.2 mM dNTP
196 (Promega, Madison, USA). For each round of selection, the PCR program was conducted at 95
197 °C for 2 min, followed by 16 PCR cycles at 95 °C for 30 s, 62 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, with
198 a final elongation at 72 °C for 30 s. After amplification, 70 μL of PCR products were stored at
199 4 °C for agarose gel analysis and 30 μL of PCR product were incubated with 2 μL of lambda
200 exonuclease (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) for 60 min at 37 °C, to generate single-
201 stranded DNA. Finally, 20 μL of ssDNA were incubated with 80 μL of Asp14 immobilized on
202 beads for a new selection cycle. In total, 12 rounds of selection (R01-R12) were performed. The
203 number of washing steps was increased during the selection process. Four washing steps were
204 performed at R02, 6 at R03 and 8 from R04 to R12.

205 **Agarose gel analysis of PCR products**

206
207 After selection, the PCR products from each SELEX round were deposited on a 4 % agarose
208 gel, pre-stained with ethidium bromide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) at 150 V for
209 13 min. For this, 5 μL of each sample were mixed with 1 μL 6 X DNA loading dye (Thermo
210 Fisher Scientific, Waltham, USA) and were deposited with 4 μL of Gene Ruler Ultra Low
211 Range DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

212

213 **Enrichment of SELEX libraries**

214

215 The binding of SELEX libraries to the recombinant Asp14 protein was compared with the
216 starting library, to evaluate the enrichment of the selection. First, the PCR products obtained
217 after automated selection were prepared to obtain ssDNA. For the SELEX performed with
218 heparin, 16 PCR cycles were conducted to amplify R01, R04, R07 and R12 PCR products (1
219 μL) with Cy5-forward primer, as few PCR products were obtained after the SELEX. For the
220 SELEX performed without heparin, 8 PCR cycles were sufficient to amplify the D2 library and
221 R01, R04, R07 and R12 PCR products with Cy5-forward primer. All PCR products were
222 deposited on 4 % agarose gel, pre-stained with ethidium bromide, to confirm amplification.
223 One hundred microliters of PCR products were incubated with 6 μL of lambda exonuclease for
224 1 h at 37 °C. The generation of ssDNA was confirmed by migration on a 4 % agarose gel, pre-
225 stained with ethidium bromide. The final ssDNA products were then purified by Nucleospin®
226 Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) using NTC buffer and according
227 to the manufacturer instructions. The final elution was performed with 20 μL of sterile water.
228 The concentration of ssDNA was measured with Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific,
229 Waltham, USA) and each ssDNA product was diluted to 10 pmol of ssDNA in 5 μL of sterile
230 water.

231 Then, SELEX libraries were incubated with Asp14 coupled to the beads, to determine their
232 affinity. The beads were coupled Asp14 and suspended in the storage buffer, as described before
233 (9.6 nmoles of Asp14 and 100 μL of beads, 1.25 X PBS with 1 mg/mL of BSA). For each
234 sample, 4 μL of beads (0.16 mg/mL) were mixed with 5 μL of one of the libraries (D2 starting
235 library, R01, R04, R07 or R12) or with sterile water as a negative control. One microliter of
236 supplementary buffer (5 X PBS, 30 mM MgCl_2 , 4 mg/mL of BSA with or without 0.5 mg/mL
237 heparin) was added. The complex was incubated for 1 h at 37 °C with 700 rpm shaking. The
238 incubation was done with the following final concentration: 1 X PBS, 3 mM MgCl_2 , 0.8 mg/mL
239 of BSA with or without 0.05 mg/mL heparin. After incubation, two washing steps were
240 performed with 100 μL of washing buffer (PBS and 3 mM MgCl_2). Finally, the beads with the
241 bound sequences were suspended in 80 μL of sterile water and analyzed by FACS Canto II (BD
242 Biosciences, Franklin Lakes, USA) with FlowJo™ software (version 10.8.1). The median
243 fluorescence intensity (MFI) of the negative control was subtracted from the MFI of each
244 aptamer to take into account non-specific background. Samples were tested in duplicates and
245 the experiments were repeated three times.

246 For the SELEX performed without heparin, the binding of libraries was also tested against the
247 uncoupled beads, according to the protocol described above.

248 **Next-Generation Sequencing**

249
250 Only the libraries recovered from the SELEX performed without heparin were analyzed by
251 Next-Generation Sequencing (NGS) on a iSeq100 instrument (Illumina) as previously
252 described [24]. For each round, tens of thousands of sequencing reads were analyzed, using a
253 homemade software (PATTERNITY-seq). Access to this software was provided by the MIRCen
254 aptamer platform (CEA, 2021). All sequences with a frequency of at least 0.004 % in a round
255 were clustered into families based on a Levenstein distance of 8 (i.e., all sequences with less
256 than 8 substitutions, deletions or insertions are grouped into the same family). The frequency
257 of each family was then calculated for each round. Multiple alignment of families was
258 performed by MultAlin (Corpet, 1988) and structure prediction was performed using Mfold
259 software. The NGS analysis allowed to choose candidate aptamers for downstream binding
260 studies.

261 **Affinity of candidate aptamers to recombinant Asp14 by flow** 262 **cytometry**

263
264 The binding affinity of aptamers was tested against the recombinant Asp14 protein coupled to
265 the beads, by flow cytometry. The chosen candidates and the scramble were synthesized with a
266 biotinylated modification at the 5'-end (**Supplementary Table S2**). The scramble was designed
267 randomly and was composed of the same constant regions as candidate aptamers. The
268 biotinylated aptamers and scramble were conjugated with streptavidin-AF 647 nm (Thermo
269 Fisher Scientific, Waltham, USA) using a 3:1 aptamer: streptavidin-AF 647 nm ratio
270 (conjugated aptamers). The complex was incubated at 4 °C for 30 min in sterile water. For K_d
271 determination, different concentrations of aptamers were tested (0 nM, 10 nM, 30 nM, 50 nM,
272 75 nM, 100 nM and 250 nM).

273 The recombinant Asp14 protein coupled to the beads was suspended in the storage buffer, as
274 described before (1.25 X PBS with 1 mg/mL BSA). For each concentration of aptamers, 5 µL
275 of aptamers were incubated with 4 µL of Asp14 coupled to beads and 1 µL of supplementary
276 buffer (5 X PBS, 30 mM MgCl₂, 4 mg/mL of BSA) for 30 min at 37 °C with 700 rpm shaking.
277 After incubation, two washing steps were performed with 100 µL of washing buffer (PBS and

278 3 mM MgCl₂). Finally, the beads were resuspended in 80 µL of sterile water and analyzed by
279 FACS Canto II (BD Biosciences) with FlowJo™ software (version 10.8.1). The negative
280 control, corresponding to streptavidin AF-647 nm only, was used and prepared in the same
281 conditions as aptamers. The median fluorescence intensity (MFI) of the scramble was
282 subtracted from the MFI of each aptamer to eliminate non-specific background. Samples were
283 tested in duplicates and the experiments were repeated three times. Finally, K_d (dissociation
284 constant) and B_{max} (maximum of fluorescence intensity) values were determined by a non-
285 linear regression analysis using GraphPadPrism 9® software.

286 **Specificity of candidate aptamers to recombinant Asp14 by flow** 287 **cytometry**

288

289 To test non-specific interactions, each aptamer at 250 nM was also incubated with the uncoupled
290 beads in a final buffer composed of 1 X PBS, 3 mM MgCl₂ and 1 mg/mL of BSA. To observe
291 the effect of heparin on the affinity, each aptamer at 250 nM was incubated with Asp14 coupled
292 to the beads in a final buffer composed of 1 X PBS, 3 mM MgCl₂, 1 mg/mL BSA and 0.01, 0.05
293 or 0.1 mg/mL heparin.

294 **Binding of candidate aptamers to an enriched suspension of** 295 ***A. phagocytophilum* NY18 strain**

296 The binding of candidate aptamers was then tested against an enriched suspension of
297 *A. phagocytophilum* NY18 strain, containing RC and DC forms [27]. The nucleotide sequence
298 of Asp14 protein was found in the genome of *A. phagocytophilum* strain NY18 (*data not*
299 *shown*). First, *A. phagocytophilum* organisms were purified from HL-60 NY18 cells, to obtain
300 an enriched suspension. The infected cells (2.10⁷ HL-60 NY18 cells) were harvested by
301 centrifugation at 500 x g for 10 min and the cell pellet was suspended in 10 mL of PBS and was
302 lysed mechanically using a Dounce homogenizer for 20 round trips. Most cellular debris were
303 pelleted after centrifugation at 750 x g during 5 min. The supernatant was filtered with a 2 µm
304 filter (Merck, Darmstadt, Germany) to remove the remaining debris. *A. phagocytophilum*
305 organisms were finally pelleted by centrifugation at 10,000 x g for 10 min.

306 Second, *A. phagocytophilum* was labelled with CellTracker Green CMFDA (Thermo Fisher
307 Scientific, Waltham, USA), as previously described [22].

308 Third, the enriched suspension of CMFDA-labelled *A. phagocytophilum* was then incubated
309 with 10 nM of the conjugated aptamers. The conjugated aptamers were diluted in 100 µL of
310 binding buffer composed of 1 X PBS, 3 mM MgCl₂, 1 mg/mL BSA, 5 mg/mL tRNA (Merck,
311 Darmstadt, Germany) and 0.1 mg/mL salmon sperm DNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham,
312 USA). The incubation was conducted at 37 °C for 30 min at 700 rpm. After incubation, four
313 washing steps were performed with 500 µL of 1 X PBS and 3 mM MgCl₂ by centrifugation at
314 10,000 x g for 6 min. The final pellet was suspended in 100 µL of 1 X PBS and 3 mM MgCl₂,
315 and the suspension was cytocentrifuged. Microscopic slides were prepared with Prolong
316 Antifade Diamond Mounting medium containing DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham,
317 USA) and were examined at a 630x magnification on Leica DMi8 microscope. Aptamers,
318 *A. phagocytophilum* and HL-60 nuclei had a red (AF-647nm), green (FITC) and blue (DAPI)
319 fluorescence respectively. Each experiment was performed in triplicates. The colocalization
320 between the red pixels (conjugated aptamer) and the green pixels (*A. phagocytophilum*) was
321 estimated with the Pearson correlation coefficient (PCC), obtained using the JacoP Plugin
322 (ImageJ software). For this, individual cells were selected (region of interest) and a composite
323 image (red and green) was created by JacoP Plugin to estimate PCC. Ten cells were analyzed
324 for one experiment, and the mean PCC was then calculated for the three experiments.

325 **Binding of candidate aptamers to *A. phagocytophilum* infected** 326 **HL- 60 cells (HL-60 NY18)**

327
328 The conjugated aptamers at 10 nM were incubated with the enriched suspension of
329 *A. phagocytophilum*, labelled with CMFDA, as described above. After the incubation and
330 washing steps, the suspension was added to a flask of healthy HL-60 cells, prepared at a
331 concentration of 2.10⁵ cells/mL. Four hours post-infection, 100 µL of cell suspension were
332 cytocentrifuged and analyzed by confocal microscopy, as described before. The same
333 experiment was performed with a lysate of uninfected HL-60 cells that served as negative
334 control.

335 **Results**

336 **Production of recombinant Asp14 protein and protein function** 337 **assay**

338 To confirm the functionality of the recombinant protein, His-tagged Asp14 was incubated with
339 HL-60 cells and detected using anti-His tag FITC antibody, by confocal microscopy (**Figure 2**).

340

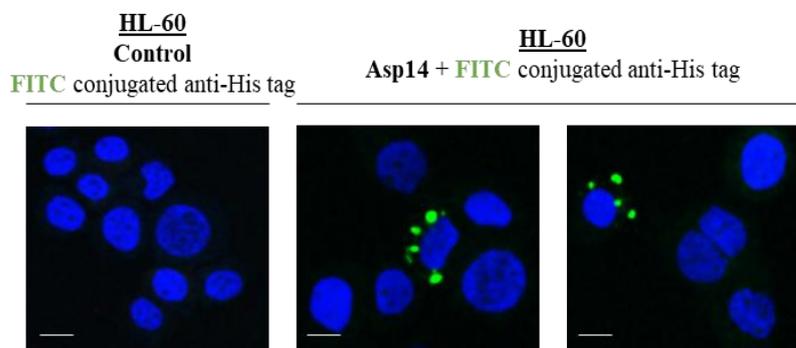


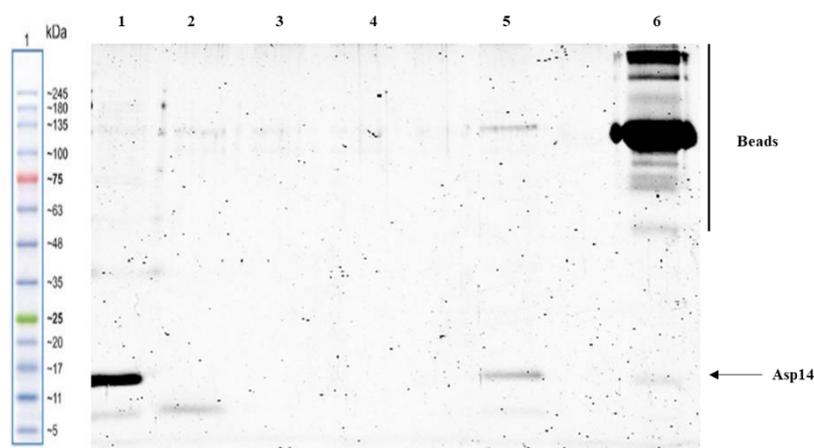
Figure 2 Binding of recombinant Asp14 to HL-60 cells. HL-60 cells were incubated with His-tagged Asp14 protein for 1 h at 37°C, followed by washing steps. The protein was detected by adding an anti-His-tag FITC antibody. The control corresponded to HL-60 cells incubated with only the anti-His-tag FITC antibody. HL-60 nuclei were labelled in DAPI (blue channel) and Asp14 was labelled in FITC (green channel). The experiment was performed twice. Scale bars represent 10 μ m.

341 No labelling was observed for the control, which corresponded to HL-60 cells incubated with
342 the anti-His-tag FITC antibody only. Conversely, HL-60 cells incubated with the recombinant
343 protein showed FITC labelling. This result confirmed that the recombinant Asp14 protein was
344 able to bind to the cell surface.

345 **Coupling of Asp14 to Dynabeads™ His-tag isolation and pull-down** 346

347 Prior to aptamer selection, the coupling of Asp14 to the beads was confirmed. After
348 immobilization on the beads, the washed fraction, the eluted fraction and the recovered fraction
349 were analyzed by SDS-PAGE (**Figure 3**). The protein was adequately immobilized on the
350 beads, as the washed fraction did not contain the protein at a detectable level. After incubation
351 with imidazole, His-tagged Asp14 was eluted from the beads, as observed on the gel. This result
352 confirmed the coupling of Asp14 to the beads, through its N-terminus 6X His-tag.

353 We also noticed the presence of a band at 135 kDa in the supernatant obtained after the elution
354 step, corresponded to the beads. This band was also observed with the beads recovered after the
355 elution. A faint band corresponding to Asp14 was also observed in the recovered fraction. Thus,
356 two imidazole elution steps would be necessary for complete elution.



358 **Figure 3** Successful coupling of recombinant Asp14 to Dynabeads™ His-tag isolation and pull-down. The
 359 recombinant protein was coupled to beads, followed by washing steps and elution with imidazole (300 mM). The
 360 washed, the eluted and the recovered beads were analyzed on SDS-PAGE. 1: Recombinant Asp14 protein (20 ng),
 361 2,3 and 4: Supernatants recovered after the washing steps, 5: Supernatant recovered after elution of the
 362 immobilized protein, 6: Dynabeads™ recovered after the elution step.

363

364 **Agarose gel analysis of PCR products from SELEX**

365

366 Two automated selections were performed to obtain DNA aptamers against Asp14 coupled to
 367 the beads. The first selection was conducted with two competitors in the binding buffer: BSA
 368 at 0.8 mg/mL and heparin at 0.05 mg/mL. After the selection, PCR products were analyzed on
 369 a 4 % agarose gel (**Figure 4A**). For R01, PCR products were obtained at 85 bp, corresponding
 370 to the amplified library. A faint band at 85 bp was also observed from R02 to R12, indicating
 371 that only few sequences were able to bind to the target.

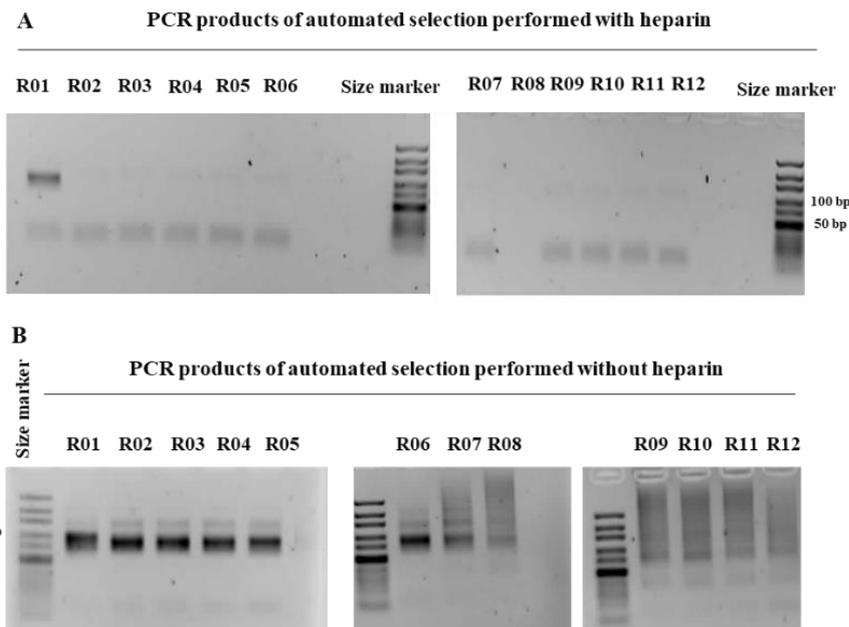


Figure 4 Agarose gel analysis of PCR products obtained with the automated selections performed against Asp14 coupled to beads. A: Agarose gel of PCR products obtained after automated selection with BSA and heparin, in the binding buffer. B: Agarose gel of PCR products after the automated selection performed with BSA, in the binding buffer.

372 We hypothesized that heparin could have a negative impact on the selection of aptamers. A new
 373 automated selection was performed using only BSA as a competitor in the binding buffer. The
 374 PCR products were loaded into a 4 % agarose gel (**Figure 4B**). Gel analysis revealed the
 375 presence of an intense band at 85 bp from R01 to R12, corresponding to the amplified library.
 376 An additional longer amplification product was noticed, at 140 bp approximately. From R06,
 377 ladder-like products were also observed on the gel.

378 **Enrichment of SELEX libraries by flow cytometry**

379 To determine whether the two SELEX were effective, the binding of libraries from R01, R04,
 380 R07 and R12 to the recombinant Asp14 was assessed by flow cytometry and compared to D2
 381 starting library binding. For the SELEX performed with heparin, the binding of R12 library was
 382 not significantly different from the binding of D2 starting library (**Figure 5**). As a result, no
 383 enhancement of the binding and no enrichment were observed. This SELEX was considered
 384 unsuccessful.

385

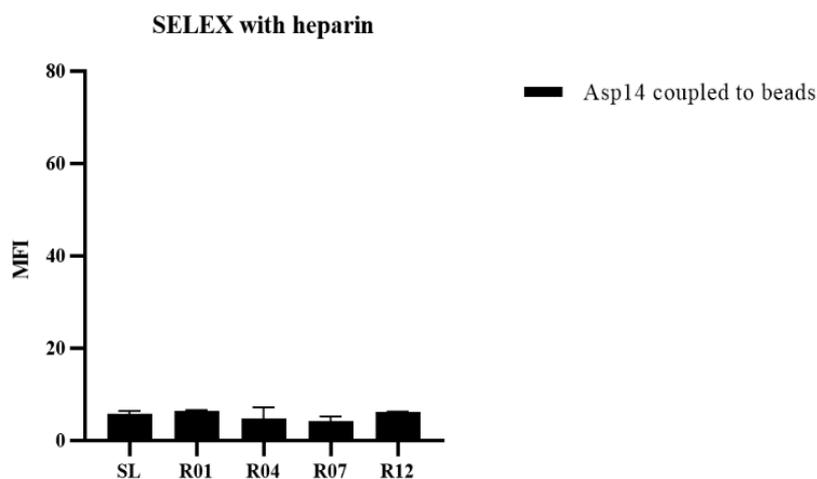


Figure 5 Binding assay of R01, R04, R07 and R12 libraries toward Asp14 coupled to the beads for the SELEX performed with heparin, by flow cytometry. The Cy5-libraries obtained from the starting library (SL), R01, R04, R07 and R12 were incubated with Asp14 coupled to beads and the fluorescence was measured by flow cytometry (MFI values, n=3, mean +/- SD).

387

388 For the SELEX performed without heparin, specific binding of libraries was assessed against
 389 Asp14 protein coupled to the beads. Non-specific binding was assessed against the uncoupled
 390 beads (**Figure 6**).

391

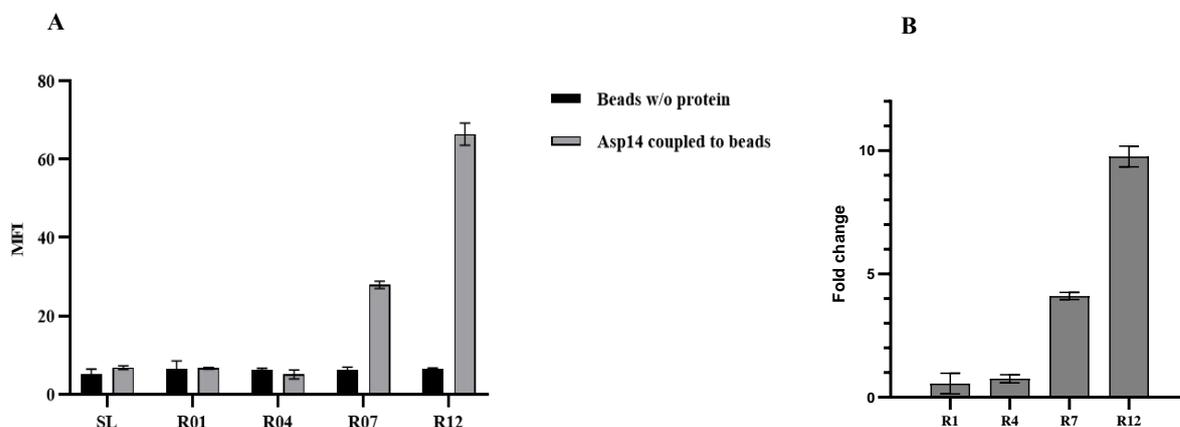


Figure 6 Binding assay of R01, R04, R07 and R12 libraries toward Asp14 coupled to the beads for the SELEX performed with heparin, by flow cytometry. **A:** The Cy5-libraries obtained from the starting library (SL), R01, R04, R07 and R12 were incubated with Asp14 coupled to beads, or the uncoupled beads and the fluorescence was measured by flow cytometry (MFI values, n=3, mean +/- SD). **B:** Fold change of DNA libraries binding against Asp14 coupled to beads, compared to the D2 starting library.

392 An important increase in binding was observed between the D2 starting library (SL) and the
 393 R12 library (**Figure 6A**). The binding of R07 library was approximately 4 times greater than
 394 that of D2 starting library, revealing an enrichment of sequences from R07 (**Figure 6B**).

395 Furthermore, this binding appears to be specific to the recombinant Asp14 protein, as no binding
396 was observed against the uncoupled beads (**Figure 6A**).

397 Next-Generation Sequencing

398

399 In view of the previous results, the libraries obtained during the selection performed without
400 heparin were sequenced. The most enriched sequences were retained for NGS analysis,
401 corresponding to 3,343 sequences with a frequency greater than 0.004 %. The number of
402 sequences above the threshold (frequency > 0.004 %) increased from R05 and then decreased
403 from R07 (**Figure 7**). Among these sequences, several were grouped in a common family. In
404 total, 2,830 families were created. Multiple alignment identified 9 conserved motifs shared
405 between amplified aptamer families (M1 to M9).

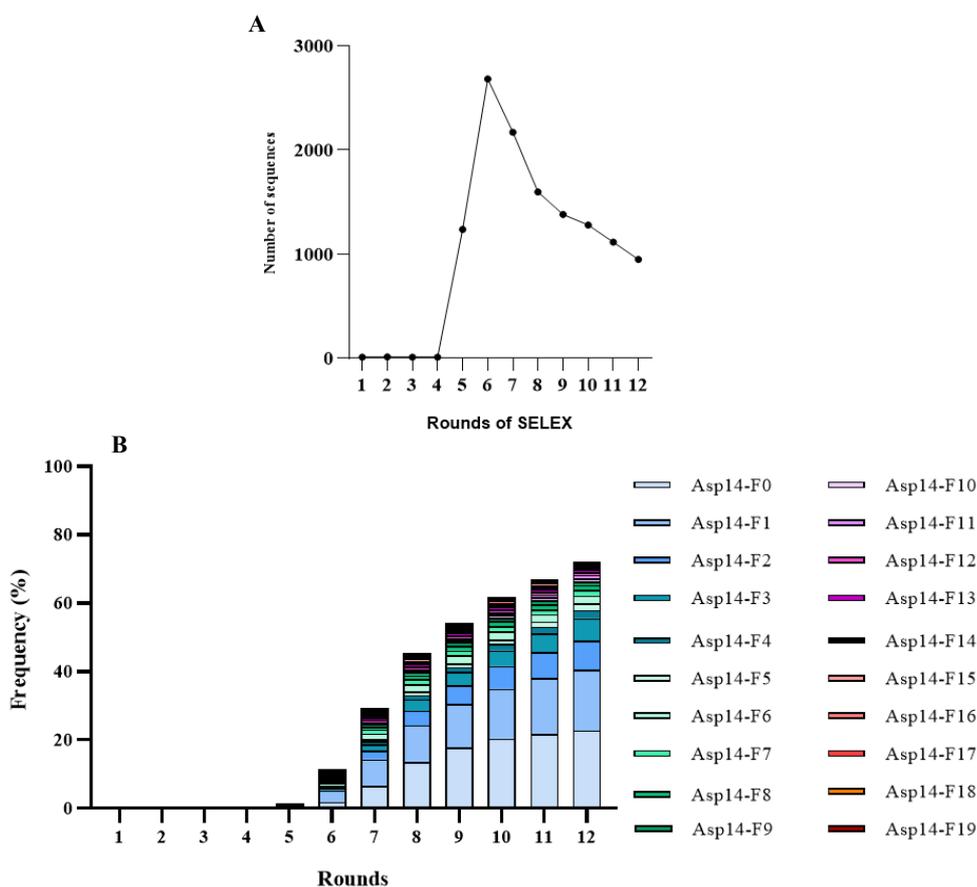


Figure 7 NGS analysis of SELEX performed without heparin. **A:** Number of sequences which frequency was > 0.004 %. **B:** Evolution of the frequency of the 20 most amplified families in the library during different rounds of SELEX.

406 The most highly enriched families were chosen (**Figure 7B**). Within each family, we chose the
407 most frequent sequence. By applying this strategy, eight sequences were selected for further
408 binding studies (Asp14-F0, Asp14-F1, Asp14-F2, Asp14-F3, Asp14-F8, Asp14-F11, Asp14-

409 F15 and Asp14-F17). The chosen sequences had different motifs, except for Asp14-F0 and
410 Asp14-F2, which shared a cytosine and an adenine at position 32-33. The evolution of their
411 frequency and their predicted secondary structures are presented in **Supplementary Figure S1**.

412 **Affinity of candidate aptamers to recombinant Asp14**

413

414 The affinity of the candidate aptamers to recombinant Asp14 was assessed by measuring their
415 K_d . The result obtained for the scramble was close to the negative control (streptavidin-AF 647
416 nm, **Figure 8**). All the candidate aptamers were characterized by fluorescence values (MFI)
417 above the scramble. The K_d obtained for the 8 sequences tested were in the nanomolar range,
418 indicating a high affinity for the target (**Figure 8B, Table 1**). Asp14-F11 had the lowest K_d and
419 therefore the highest affinity.

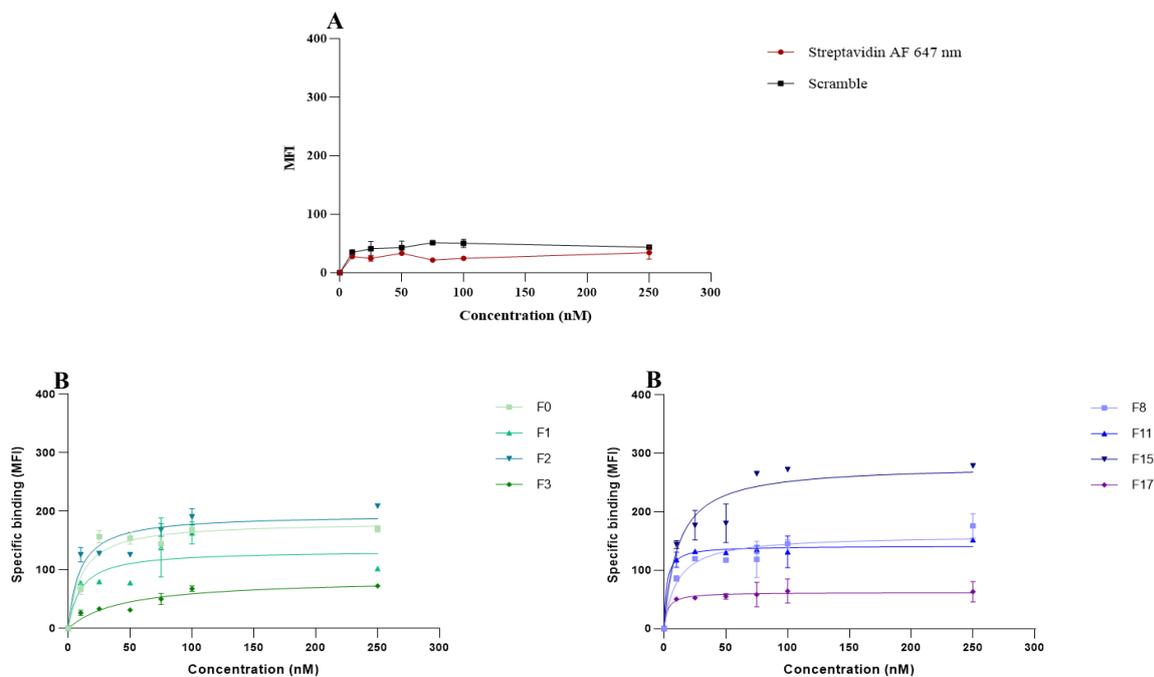


Figure 8 Affinity of candidate aptamers against the recombinant Asp14 protein coupled to beads, by flow cytometry. A: Representation of MFI values obtained for the negative control (streptavidin AF-647 nm) and the scramble sequence. B: Representation of the specific binding curves of aptamers against Asp14 coupled to beads. The MFI value of the scramble was subtracted from the MFI values of the aptamers. Error bars represent the standard deviation of the duplicates.

420

421

422

423 **Table 1** Average Kd and range of Bmax values +/- standard deviation for three experiments, calculated from graphs
 424 representing sequence-specific binding.

Affinity	Asp14-F0	Asp14-F1	Asp14-F2	Asp14-F3	Asp14-F8	Asp14-F11	Asp14-F15	Asp14-F17
Kd (nM)	22.97 +/- 14.5	10.86 +/- 5.90	9.14 +/- 0.16	30.53 +/- 9.23	11.79 +/- 3.62	5.49 +/- 2.26	11.03 +/- 1.19	12.21 +/- 6.24
Bmax	[182.3- 409.2]	[133.1 – 240]	[194.6 –369.2]	[85.06-142]	[159.9- 371.2]	[141.7-361]	[280.2- 322.1]	[62- 626]

425

426 **Specificity of candidate aptamers to recombinant Asp14 protein**

427 The target of these sequences could be the recombinant Asp14 protein, or the beads used as a
 428 support. To evaluate their specificity, aptamers at 250 nM were incubated with the beads without
 429 the protein. No binding was observed for any of the aptamer (**Supplementary Figure S2**).

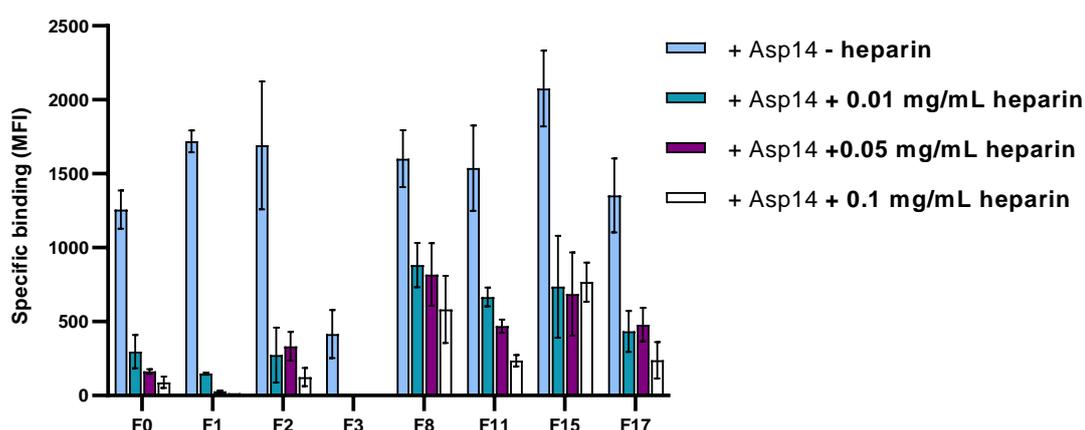


Figure 9 Binding assay of candidate aptamers to recombinant Asp14 protein coupled to the beads, with or without heparin. The conjugated aptamers at 250 nM were incubated with beads or Asp14 coupled to beads. The MFI values of the scramble were subtracted from MFI values of each aptamer. Error bars represent the standard deviation of the duplicates (MFI values, n=2, mean +/- SD).

430 As we had previously demonstrated that heparin can negatively impact the SELEX, the binding
 431 of candidate aptamers to the recombinant protein was tested in the presence of BSA and heparin
 432 at different concentrations (**Figure 9**). In the presence of heparin, the binding was significantly
 433 reduced for all candidate aptamers. Asp14-F1 and Asp14-F3 lost completely their affinity for
 434 their target in the presence of high concentrations of heparin. Very weak binding was also
 435 observed for Asp14-F0 and Asp14-F2. Conversely, for Asp14-F8, Asp14-F11, Asp14-F15 and
 436 Asp14-F17, the binding in presence of high concentrations of heparin remained considerably
 437 higher than that of the scramble. This indicates the presence of specific and strong interactions
 438 with the protein.

439 **Binding of candidate aptamers to an enriched suspension of**
440 ***A. phagocytophilum* NY18 strain**
441

442 Aptamers selected against the recombinant Asp14 protein may not recognize this membrane
443 protein in its native state [28]. The binding of aptamers was therefore tested against an enriched
444 suspension of *A. phagocytophilum*, obtained after purification of bacteria from HL-60 NY18
445 cells. In the literature, this method of purification allowed for the recovery of both RC and DC
446 forms [27]. The binding of aptamers to the enriched suspension was observed by confocal
447 microscopy (**Figure 10**).

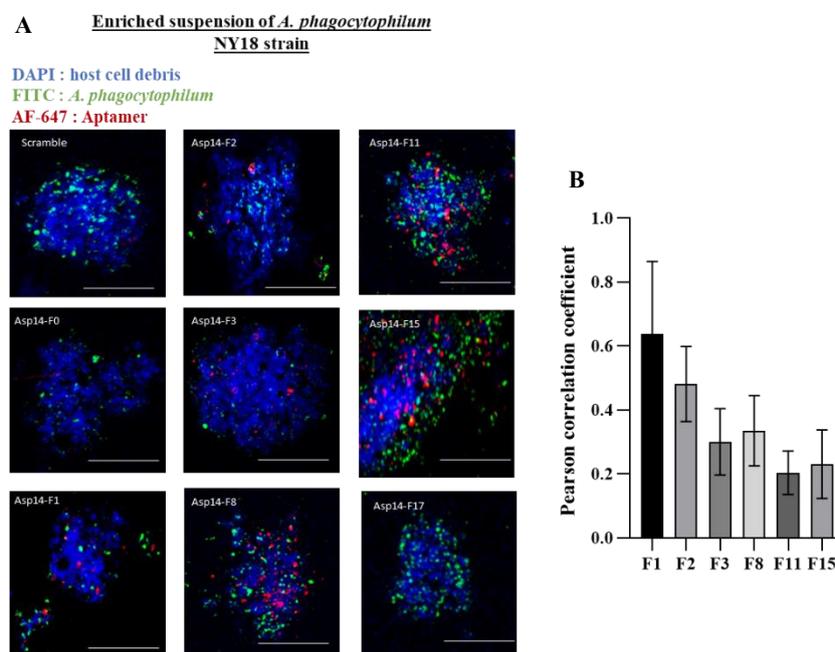


Figure 10 A: Binding assay of candidate aptamers to an enriched suspension of *A. phagocytophilum* NY18 strain, by confocal microscopy. Host cell nuclei were labelled with DAPI, *A. phagocytophilum* was labelled with CMFDA (green) and aptamers were conjugated with streptavidin-AF 647 nm. Scale bars represent 20 μ m. **B:** Study of colocalization between the green (*A. phagocytophilum*) and the red (aptamers) channels. Estimation of the average of Pearson correlation coefficient, obtained by JacoP PlugIn (Image J software) (PCC values, n=10, mean +/- SD).

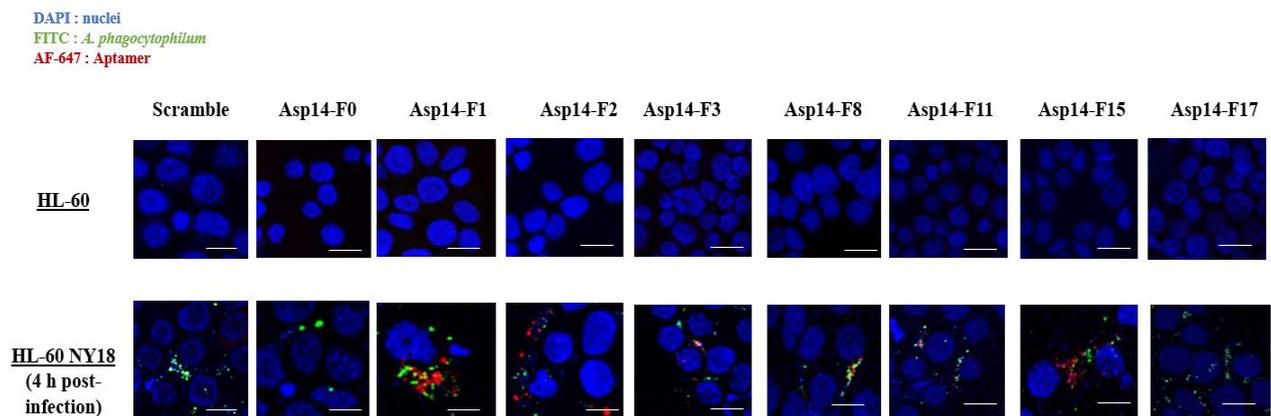
448 First, we can validate our staining conditions, as no labelling was observed for the scramble,
449 indicating the absence of non-specific interactions. Unfortunately, we did not observe any
450 labelling for Asp14-F0 and Asp14-F17 against the enriched suspension of *A. phagocytophilum*.
451 These aptamers were able to bind to the recombinant Asp14 protein but do not appear to
452 recognize the protein in its native state. For Asp14-F1, Asp14-F2, Asp14-F3, Asp14-F8, Asp14-
453 F11 and Asp14-F15, a strong labelling was observed compared to the scramble, indicating that
454 they were able to recognize their target in the enriched suspension of *A. phagocytophilum*. We

455 also determined the Pearson correlation coefficient (PCC), to analyze the colocalization
456 between the green channel (*A. phagocytophilum*) and the red channel (aptamers). The results
457 obtained for PCC were in the range 0.2 to 0.6, meaning a partial colocalization between the
458 aptamers and *A. phagocytophilum* organisms.

459 **Binding of candidate aptamers to *A. phagocytophilum* infected** 460 **HL-60 cells (HL-60 NY18)**

461

462 To confirm that aptamers recognize DC forms of *A. phagocytophilum*, the enriched suspension
463 incubated with aptamers was used to infect HL-60 cells. The binding of aptamers was assessed
464 by confocal microscopy, after 4 h of infection (**Figure 11**). No labelling was observed for the
465 scramble, confirming the absence of non-specific interactions. For all the candidate aptamers,
466 no labelling was detected in non-infected HL-60 cells, meaning that none of the candidate
467 aptamers recognized these healthy permissive cells.



468 **Figure 11** Binding assay of candidate aptamers by confocal microscopy. The conjugated aptamers were pre-
469 incubated with the enriched suspension of *A. phagocytophilum* NY18 strain and used to infect HL-60 cells. Four
470 hours post-infection, the binding was observed by confocal microscopy. The nuclei were labelled with DAPI,
471 *A. phagocytophilum* was labelled with CMFDA (green) and the aptamers were conjugated with streptavidin-AF
472 647 nm. Scale bars represent 10 μ m.

473 On the contrary, labelling was observed in infected cells for all candidate aptamers except
474 Asp14-F0 and Asp14-F17, consistent with previous results on the enriched suspension. Our
475 results strongly suggest that six of the selected aptamers could be specific for Asp14 expressed
476 by extracellular DC forms, allowing an intracellular fluorescent signal to be obtained after
477 invasion of the host cells by *A. phagocytophilum* with aptamers bound to their surface.

478

479 Discussion

480

481 The protein Asp14 appears to be a promising target to obtain aptamers against
482 *A. phagocytophilum*, as this protein is located at the surface of DC forms, with a C-terminal
483 binding domain, and is overexpressed during the invasion of *A. phagocytophilum* in
484 mammalian host cells [13].

485 To select aptamers, the first step was to choose the chemistry of the initial library, as well as
486 the type of selection. A DNA library was chosen for its stability and low-cost, compared with
487 an RNA library [29]. As the manual SELEX is a tedious process, which can take several weeks,
488 we decided to perform the SELEX on a robotic platform, specially developed to select aptamers
489 against purified proteins [23]. This automated selection has many advantages as it considerably
490 reduces selection time, as well as random and operational errors [23]. Twelve selection cycles
491 can be carried out in only two days. Such an automated process resulted in the selection of
492 functional aptamers against Erk2 protein, a serine/threonine kinase, and against SARS-CoV-2
493 spike protein [23,30]. However, this platform is not as flexible as a manual SELEX, which
494 could be problematic because, as the selection rounds progress, increasingly stringent
495 conditions must be applied to obtain affine and specific aptamers (addition of competitors,
496 reduction in target concentration, increase in washings, etc.). Yet, only the number of washes
497 and the number of PCR cycles can be modified on the robotic platform [23]. The automated
498 SELEX protocol also does not include purification steps, after the PCR steps and after the
499 ssDNA generation steps. These purification steps are essential to eliminate the components of
500 the PCR mix (primers, dNTP, etc.), the lambda exonuclease and to obtain high-quality ssDNA
501 products [31]. Another important disadvantage is that the evolution of the selection cannot be
502 monitored during the automated SELEX. Consequently, in the event of an error, the automated
503 selection continues, resulting in a loss of material [23]. The evolution of the SELEX can
504 therefore only be documented at the end of the selection (analysis of PCR products on gel,
505 evaluation of enrichment by NGS analysis and/or flow cytometry, etc.). Despite these
506 drawbacks, the automated selection enabled for rapid results and thus for testing different
507 selection conditions in a short period of time.

508 The robotic platform was developed to select aptamers against proteins immobilized on
509 magnetic beads, such as proteins coupled to DynabeadsTM His-tag isolation and pull-down. The
510 recombinant Asp14 was therefore produced in the *E. coli* bacterial system, with N-terminus 6

511 X His-tag, so as not to impact the C-terminal domain. Prior to selection, a preliminary study
512 was carried out to validate the binding of Asp14 to HL-60 cells. The recombinant protein seems
513 to maintain the invasion function of Asp14, as the protein was able to bind to the surface of
514 vertebrate cells permissive to *A. phagocytophilum*. Before selection, the coupling of Asp14 to
515 beads was also confirmed as His-tag residues were efficiently captured.

516 A first automated selection was performed with a binding buffer, composed of PBS, MgCl₂ to
517 stabilize the secondary structure, and BSA and heparin as competitors. This selection was
518 unsuccessful, as no enhancement of binding was observed between D2 starting library and R12.
519 Several hypotheses can be put forward to explain these results. First, a pipetting error by the
520 robot may have occurred. However, no error was indicated by the software and the final
521 volumes recovered were correct. We can also consider that an error occurred during the
522 amplification of sequences and/or during the generation of ssDNA, caused by a lack of
523 efficiency in the PCR mix and/or the lambda exonuclease. However, a compulsory quality
524 control was carried out before starting the selection and confirmed the effectiveness of the PCR
525 mix and lambda exonuclease. These two hypotheses are therefore unlikely. The failure of this
526 selection seems to be intrinsic to the conditions applied. The binding buffer contained two
527 competitors (BSA and heparin); these conditions were perhaps too stringent and may have been
528 responsible for the failure of the SELEX. BSA is commonly used as a competitor in SELEX
529 performed on recombinant proteins. Albumin competes with the recombinant protein, so only
530 highly specific sequences will bind to the protein target. Heparin is occasionally used as a
531 competitor during the selection of aptamers against protein targets [28], because of its negative
532 charge. DynabeadsTM His-tag isolation and pull-down are coated with cobalt, a divalent cation
533 that tethers the histidine residues of the protein. The positively-charged cobalt ion can also bind
534 to sequences in a non-specific manner resulting in selection of random aptamers[28]. Heparin,
535 through its negative charge, minimizes this effect, by interacting with cobalt on the surface of
536 beads. However, the Asp14 protein also has a positive charge (+ 4,91) in its C-terminal domain
537 (amino acids 101 to 124) [13]. Heparin can also interact with the protein and could block
538 sterically the binding of aptamer sequences. We therefore hypothesized that the addition of
539 heparin as a competitor could have led to the failure of SELEX.

540 This hypothesis led us to carry out a new selection under the same conditions but in the absence
541 of heparin in the binding buffer. At the end of the selection, PCR products were obtained at all
542 rounds of selection, so many sequences were able to bind to the target. Two particular types of
543 “PCR-by-products” were produced, a higher product (140 bp) and a ladder-like product. These

544 products can be formed by primer-primer hybridization and/or by partial binding of primers to
545 complementary bases located near the random region of sequences. The partial binding is then
546 extended by the polymerase and produce longer DNA products [32]. During the selection, these
547 non-specific products accumulate and can dominate the ssDNA pool, leading to the failure of
548 SELEX. The optimization of the number of PCR cycles can limit this phenomenon [33].
549 However, this optimization was not possible on the automated platform [23]. The enrichment
550 of SELEX was then assessed by flow cytometry. An increase in binding of libraries from R07
551 was observed, compared to the starting library. This result indicated the enrichment of affine
552 sequences during the SELEX, confirming its success. This enrichment was also confirmed
553 clearly from R06 by NGS analysis. In addition, this binding appears to be specific to the
554 recombinant Asp14 protein, as no binding was observed against the beads without Asp14.
555 Despite the significant presence of “PCR-by-products”, the automated selection performed
556 using BSA alone as a competitor was successful. This result also validated our hypothesis that
557 heparin had a negative impact on the selection of aptamers against the Asp14 protein.

558 The sequences obtained with the automated selection performed without heparin were analyzed
559 by NGS. This analysis demonstrated that the enriched sequences shared many common patterns
560 and identical stem-loop structures. This observation may reveal a same binding site recognized
561 by some sequences. In total, eight sequences (Asp14-F0, Asp14-F1, Asp14-F2, Asp14-F3,
562 Asp14-F8, Asp14-F11, Asp14-F15 and Asp14-F17) were chosen for binding studies, because
563 of their high enrichment.

564 The affinity studies were divided into three parts. First, the binding of candidate aptamers was
565 tested against the recombinant Asp14 protein coupled to the beads or against the uncoupled
566 beads. The negative selection step cannot be applied during automated selection, which may
567 lead to the enrichment of non-specific sequences recognizing the immobilization support (bead
568 surface). Fortunately, the candidate aptamers demonstrated no affinity for the uncoupled beads.
569 In addition, all the candidate aptamers demonstrated a high affinity against the recombinant
570 Asp14 protein coupled to beads, with a K_d in the nanomolar range. Interestingly, the addition
571 of heparin in the binding buffer considerably affected the binding of all candidate aptamers
572 against the recombinant protein. For Asp14-F1 and Asp14-F3, this binding was completely lost
573 at high concentrations (0.1 mg/mL heparin). In view of these results, we can hypothesize that
574 Asp14-F1 and Asp14-F3 recognize the positively charged C-terminal domain of Asp14 with
575 less specificity.

576 Second, the binding of candidate aptamers was tested by confocal microscopy against an
577 enriched suspension of *A. phagocytophilum* obtained from HL-60 NY18 cells and containing
578 DC and RC forms. Asp14 is localized at the surface of the outer membrane of DC forms of
579 *A. phagocytophilum*, and the sequence of the recombinant protein was identified by a previous
580 study from *A. phagocytophilum* NCH-1 strain [13]. As *A. phagocytophilum* NCH-1 strain is not
581 available in our laboratory, we used NY18, another American human strain. The expression of
582 Asp14 in this infection model is not confirmed but the Asp14 gene is also expressed by many
583 other strains of several different species and origins (canine, rodent, sheep strains,...). We could
584 therefore hypothesize that this protein is also expressed in NY18 strain. The results
585 demonstrated that two candidate aptamers were not able to bind to the enriched suspension
586 (Asp14-F0 and Asp14-F17). These aptamers do not appear to recognize the protein in its native
587 state. Their binding site could be a region of Asp14 that is not accessible to aptamers, such as a
588 part anchored in the membrane of *A. phagocytophilum*. It is also possible that these aptamers
589 recognize a region of Asp14 that is not expressed in strain NY18. For Asp14-F1, Asp14-F2,
590 Asp14-F3, Asp14-F8, Asp14-F11 and Asp14-F15, strong binding was observed with the
591 enriched suspension of *A. phagocytophilum* strain NY18. A partial colocalization was observed
592 between the aptamers and *A. phagocytophilum* stained with CMFDA. This is not surprising
593 since CMFDA labelled DC forms, as well as RC forms. This could explain the partial
594 colocalization observed.

595 Third, the enriched suspension of *A. phagocytophilum* strain NY18 incubated with aptamers
596 was then used to infect HL-60 cells and binding was observed after 4 h of incubation by
597 confocal microscopy. A previous study demonstrated that Asp14 is overexpressed at 4 h of
598 infection in HL-60 NCH-1 [13]. The aim of this experiment was to verify that aptamers
599 recognized DC forms, as only these forms are able to invade and infect mammalian host cells.
600 The results obtained were consistent with the previous experiment. Except Asp14-F0 and
601 Asp14-F17, the other aptamers were able to bind to their target present at the surface of DC
602 forms of *A. phagocytophilum* NY18 strain and to consequently invade HL-60 cells.

603 At this stage of the study, we cannot confirm that aptamers are specific to Asp14 expressed by
604 strain NY18. It would be necessary to confirm the expression of the protein in HL-60 NY18
605 cells by Western blot. Detection could be performed with selected aptamers, or a polyclonal
606 serum raised against the recombinant protein. It is also possible that the candidate aptamers
607 recognize a protein similar to Asp14. It would have been interesting to test the affinity of these
608 aptamers against other *A. phagocytophilum* membrane proteins, such as OmpA or AipA. The

609 next step is therefore to confirm that their target is Asp14, by Western blot or SDS-PAGE after
610 capture of the target on beads coupled to the aptamers.

611 In the long-term, Asp14-specific aptamers would represent a real opportunity to improve
612 research, diagnosis and treatment of *A. phagocytophilum* infection. These aptamers could be
613 used to develop a bacterial capture method for improving *A. phagocytophilum* isolation and
614 culture and help overcome the methodological difficulties currently encountered by research
615 teams. This method would also be of interest for improving the sensitivity of current diagnostic
616 tools. Their use for diagnosis must be cautious, as two regions (amino acids 19-61 and 101-
617 115) are almost identically conserved in *A. marginale* and in *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis* and
618 *E. ruminantium* [13]. It would be necessary to test these aptamers against these other pathogenic
619 intracellular bacteria. Finally, Asp14 is a critical protein in infection, as demonstrated in
620 previous studies. It would therefore be interesting to observe the antibacterial effect of these
621 aptamers to pave the way for an innovative therapeutic approach without antibiotics, to limit
622 antibiotic resistance, in line with the One Health concept.

623 Conclusion

624

625 This study constitutes a first step towards obtaining aptamers against the Asp14 protein,
626 expressed on DC forms of *A. phagocytophilum*. The use of the automated selection has once
627 again demonstrated its value in the selection of aptamers against purified proteins. Eight
628 sequences were successfully selected by automated selection and had a high affinity for the
629 recombinant Asp14 protein. This study also demonstrated for the first time the adverse effect
630 heparin can have on aptamer selection. Although strongly recommended as a competitor in
631 previous studies, it should be used with caution, particularly with positive-charged proteins.
632 Finally, of the eight selected sequences, six seems to recognize their target, Asp14, in the HL-
633 60 NY18 cell model, paving the way to a variety of applications.

634

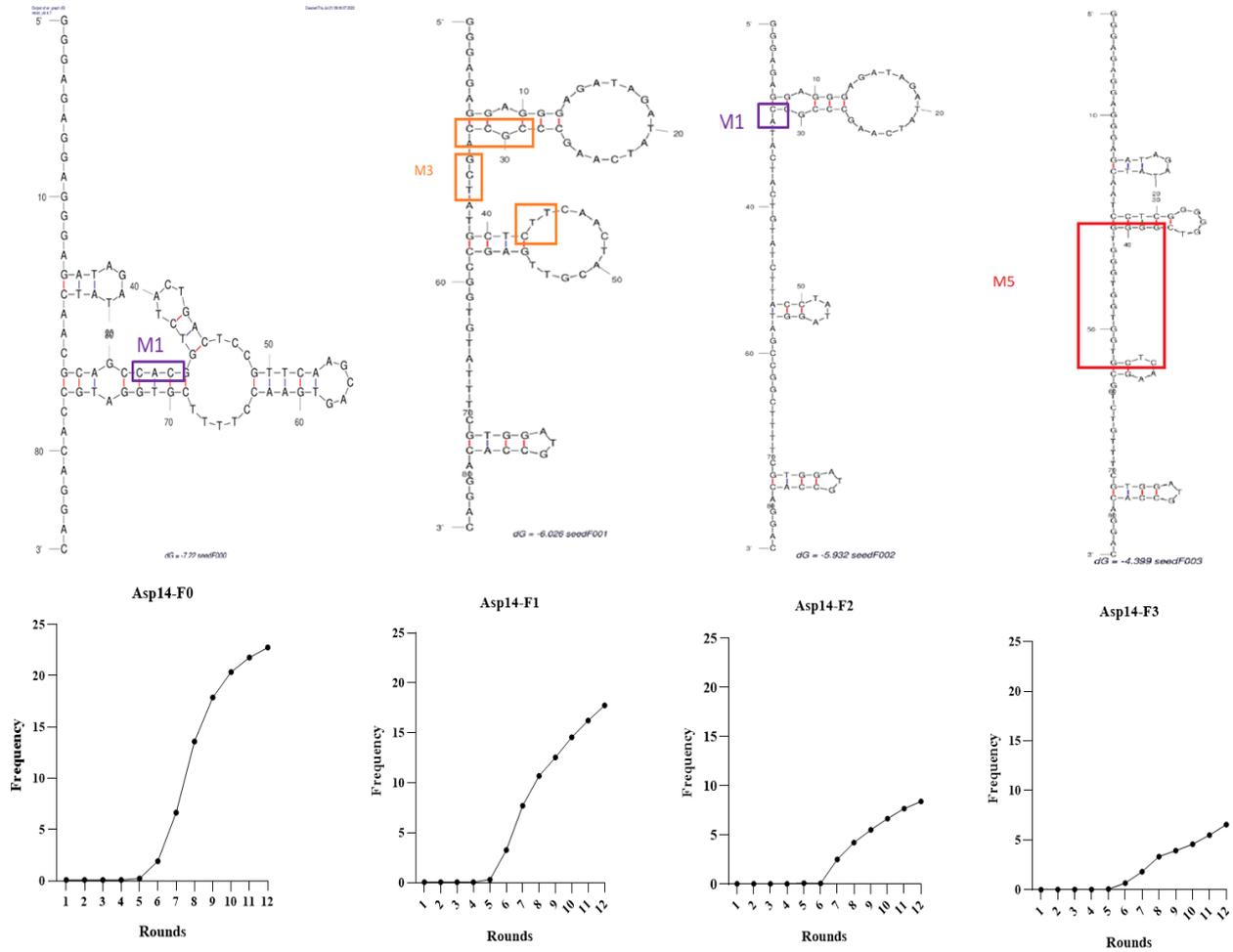
635

636

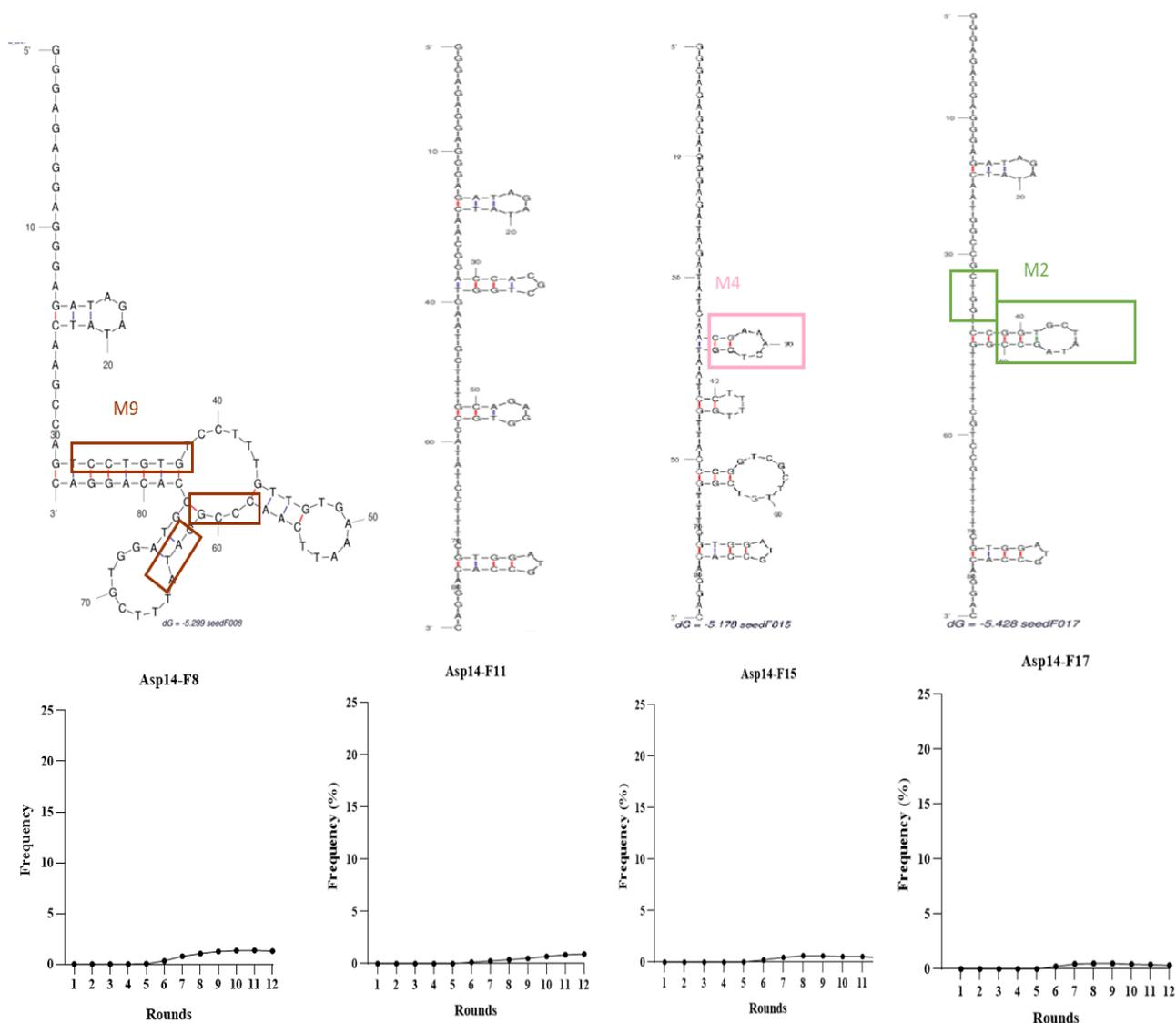
637

Supplementary data

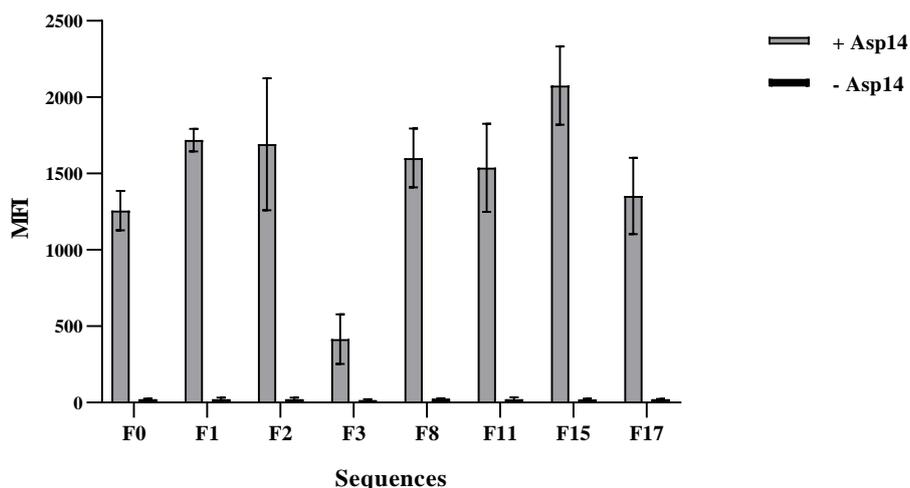
638



639



Supplementary Figure S1 Evolution of the frequency (%) and predicted secondary structures of the candidate aptamers (Asp14-F0, Asp14-F1, Asp14-F2, Asp14-F3, Asp14-F8, Asp14-F11, Asp14-F15 and Asp14-F17). The boxes represent common motifs shared with other sequences.



643

644 **Supplementary Figure S2: Binding assay of candidate aptamers to recombinant Asp14 protein coupled to**
 645 **the beads, or to the beads only.** The conjugated aptamers at 250 nM were incubated with beads or Asp14 coupled
 646 to beads. The MFI values of the scramble were subtracted from MFI values of each aptamer. Error bars represent
 647 the standard deviation of the duplicates (MFI values, n=2, mean +/- SD).

648

649

Supplementary Table S1 Initial DNA library used for SELEX and primers.

D2-forward	5'-GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAA-3'
Phosphorylated D2-reverse	5'-GTCCTGTGGCATCCACGAAA-3'
D2 library	5'-GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAA-N40-TTTCGTGGATGCCACAGGAC-3'

650

651

Supplementary Table S2 Sequences of candidate aptamers and scramble

Scramble	GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAACAGTCACACGGTTCTCTCATGCATGTATACGGCTTGCATGTTTCGTGGATGCCACAGGAC
Asp14-F0	GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAACGCAGCCACGGTCTACTGACTCCGTTCAAGCAGTGAACCTTTTCGTGGATGCCACAGGAC
Asp14-F1	GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAAGCCCGCCAGCTATGCTCTTCAACTACGTTGAGCCGGTGTATTTTCGTGGATGCCACAGGAC
Asp14-F2	GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAAGCCCGCCATACTACTGTATCTTACCTATAGGTAGCCGGCTTTTCGTGGATGCCACAGGAC
Asp14-F3	GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAATCCTCGGGGTCGGGGTGGTGGTGGTCTCAAGCGTCTGTTTCGTGGATGCCACAGGAC
Asp14-F8	GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAAGCCAGTCCTGTGTCTTTGTTGTGAAATCAACCCGCATATTTTCGTGGATGCCACAGGAC
Asp14-F11	GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAACGGACCACGCTGGTGAATGCTTTGCAGAGGTGCCATATCCTTTTCGTGGATGCCACAGGAC
Asp14-F15	GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAACGAAACTCGTAATCCTTTTGGTTACCCGGTCGCTTGTCCGGTTTCGTGGATGCCACAGGAC
Asp14-F17	GGGAGAGGAGGGAGATAGATATCAATGGCCGCTGGTCCGGTGCTATAGCCGGTTTTTCGTCCGTTTTTCGTGGATGCCACAGGAC

652

653 **Conflict of Interest**

654

655 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or
 656 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

657

658 **Author Contributions**

659 Conceptualization, L.L.D.; methodology, L.L.D; software, L.L.D, F.D.; validation, L.L.D, C.R,
660 S.B, G.M, F.D, H-J.B, P.L.D, A-C.L, N.H; formal analysis, L.L.D; investigation, L.L.D.; SB;
661 GM; resources, H-J.B, P.L.D, A-C.L, N.H; data curation, L.L.D; writing—original draft
662 preparation, L.L.D; writing—review and editing, L.L.D, C.R, S.B, G.M, F.D, H-J.B, P.L.D,
663 A- C.L, N.H; visualization, L.L.D, C.R, S.B, G.M, H-J.B, F.D, P.L.D, A-C.L, N.H; supervision,
664 H-J.B, P.L.D, A-C.L, N.H; project administration, H-J.B, P.L.D, A-C.L, N.H; funding
665 acquisition, H-J.B, P.L.D, A-C.L, N.H.

666 **Funding**

667

668 This work was partially funded by the Ecole nationale vétérinaire d’Alfort (EnvA) and was
669 supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety
670 (ANSES). LLD was funded by ABIES from AgroParisTech. UMR BIPAR is supported by the
671 French Government’s Investissement d’Avenir program, Laboratoire d’Excellence “Integrative
672 Biology of Emerging Infectious Diseases” (grant No. ANR-10-LABEX-62-IBEID).

673

674 **References**

675

- 676 1. Dugat T, Lagrée AC, Maillard R, Boulouis HJ, Haddad N. Opening the black box of
677 *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. Front Cell
678 Infect Microbiol. 2015 Aug 14;5:61.
- 679 2. Green RS, Naimi WA, Oliver LD, O’Bier N, Cho J, Conrad DH, et al. Binding of Host Cell
680 Surface Protein Disulfide Isomerase by *Anaplasma phagocytophilum* Asp14 Enables
681 Pathogen Infection. mBio. 2020 Jan 28;11(1):e03141-19.
- 682 3. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [cited 2022 Jun 15]. Tickborne
683 disease surveillance data summary | CDC. Available from: [https://www.cdc.gov/ticks/data-
684 summary/index.html](https://www.cdc.gov/ticks/data-summary/index.html)
- 685 4. Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host
686 pathogen with highly adaptive strategies. Front Cell Infect Microbiol. 2013 Jul 22;3:31.
- 687 5. Matei IA, Estrada-Peña A, Cutler SJ, Vayssier-Taussat M, Varela-Castro L, Potkonjak A, et
688 al. A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic
689 anaplasmosis and its agent in Europe. Parasit Vectors. 2019 Dec 21;12(1):599.

- 690 6. Rikihisa Y. Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma*
691 *phagocytophilum*. Clin Microbiol Rev. 2011 Jul;24(3):469–89.
- 692 7. Bonilla MC, Fingerhut L, Alfonso-Castro A, Mergani A, Schwennen C, von Köckritz-
693 Blickwede M, et al. How Long Does a Neutrophil Live? The Effect of 24 h Whole Blood
694 Storage on Neutrophil Functions in Pigs. Biomedicines. 2020 Aug 8;8(8):278.
- 695 8. Herron MJ, Ericson ME, Kurtti TJ, Munderloh UG. The Interactions of *Anaplasma*
696 *phagocytophilum*, Endothelial Cells, and Human Neutrophils. Ann N Y Acad Sci.
697 2005;1063(1):374–82.
- 698 9. Heinzen RA, Hackstadt T, Samuel JE. Developmental biology of *Coxiella burnettii*. Trends
699 Microbiol. 1999 Apr;7(4):149–54.
- 700 10. Zhang J zhi, Popov VL, Gao S, Walker DH, Yu X jie. The developmental cycle of *Ehrlichia*
701 *chaffeensis* in vertebrate cells. Cell Microbiol. 2007 Mar;9(3):610–8.
- 702 11. Carlyon JA, Fikrig E. Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. Cell
703 Microbiol. 2003;5(11):743–54.
- 704 12. Ojogun N, Kahlon A, Ragland SA, Troese MJ, Mastronunzio JE, Walker NJ, et al.
705 *Anaplasma phagocytophilum* Outer Membrane Protein A Interacts with Sialylated
706 Glycoproteins To Promote Infection of Mammalian Host Cells. Infect Immun. 2012
707 Nov;80(11):3748–60.
- 708 13. Kahlon A, Ojogun N, Ragland SA, Seidman D, Troese MJ, Ottens AK, et al. *Anaplasma*
709 *phagocytophilum* Asp14 is an invasin that interacts with mammalian host cells via its C
710 terminus to facilitate infection. Infect Immun. 2013 Jan;81(1):65–79.
- 711 14. Seidman D, Ojogun N, Walker NJ, Mastronunzio J, Kahlon A, Hebert KS, et al. *Anaplasma*
712 *phagocytophilum* surface protein AipA mediates invasion of mammalian host cells. Cell
713 Microbiol. 2014;16(8):1133–45.
- 714 15. Seidman D, Hebert KS, Truchan HK, Miller DP, Tegels BK, Marconi RT, et al. Essential
715 Domains of *Anaplasma phagocytophilum* Invasins Utilized to Infect Mammalian Host
716 Cells. PLOS Pathog. 2015 Feb 6;11(2):e1004669.
- 717 16. Naimi WA, Gumpf JJ, Green RS, Izac JR, Zellner MP, Conrad DH, et al. Immunization
718 against *Anaplasma phagocytophilum* Adhesin Binding Domains Confers Protection against
719 Infection in the Mouse Model. Infect Immun. 2020 Sep 18;88(10):e00106-20.
- 720 17. Joshi R, Janagama H, Dwivedi HP, Senthil Kumar TMA, Jaykus LA, Schefers J, et al.
721 Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection
722 of *Salmonella enterica* serovars. Mol Cell Probes. 2009 Feb;23(1):20–8.
- 723 18. Zhang Y, Lai BS, Juhas M. Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. Mol
724 Basel Switz. 2019 Mar 7;24(5):E941.
- 725 19. Afrasiabi S, Pourhajibagher M, Raoofian R, Tabarzad M, Bahador A. Therapeutic
726 applications of nucleic acid aptamers in microbial infections. J Biomed Sci. 2020 Jan
727 3;27:6.

- 728 20. Liu L, Han Z, An F, Gong X, Zhao C, Zheng W, et al. Aptamer-based biosensors for the
729 diagnosis of sepsis. *J Nanobiotechnology*. 2021 Jul 19;19(1):216.
- 730 21. Asanovich KM, Bakken JS, Madigan JE, Aguero-Rosenfeld M, Wormser GP, Dumler JS.
731 Antigenic diversity of granulocytic Ehrlichia isolates from humans in Wisconsin and New
732 York and a horse in California. *J Infect Dis*. 1997 Oct;176(4):1029–34.
- 733 22. Carlyon JA. Laboratory Maintenance of *Anaplasma phagocytophilum*. *Curr Protoc*
734 *Microbiol*. 2005;00(1):3A.2.1-3A.2.30.
- 735 23. Breuers S, Bryant LL, Legen T, Mayer G. Robotic assisted generation of 2'-deoxy-2'-
736 fluoro-modified RNA aptamers – High performance enabling strategies in aptamer
737 selection. *Methods*. 2019 May 15;161:3–9.
- 738 24. Quang N, Perret G, Ducongé F. Applications of High-Throughput Sequencing for *In Vitro*
739 Selection and Characterization of Aptamers. *Pharmaceuticals*. 2016 Dec 10;9(4):76.
- 740 25. CEA. CEA/François Jacob Institute of biology. CEA; 2021 [cited 2023 Apr 13]. Aptamers.
741 Available from:
742 [https://www.cea.fr/drf/ifrancoisjacob/english/Pages/Departments/MIRCen/Platforms/Apta](https://www.cea.fr/drf/ifrancoisjacob/english/Pages/Departments/MIRCen/Platforms/Aptamers.aspx)
743 [mers.aspx](https://www.cea.fr/drf/ifrancoisjacob/english/Pages/Departments/MIRCen/Platforms/Aptamers.aspx)
- 744 26. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*.
745 1988 Nov 25;16(22):10881–90.
- 746 27. Troese MJ, Kahlon A, Ragland SA, Ottens AK, Ojogun N, Nelson KT, et al. Proteomic
747 Analysis of *Anaplasma phagocytophilum* during Infection of Human Myeloid Cells
748 Identifies a Protein That Is Pronouncedly Upregulated on the Infectious Dense-Cored Cell
749 ν . *Infect Immun*. 2011 Nov;79(11):4696–707.
- 750 28. Wang T, Yin W, AlShamaileh H, Zhang Y, Tran PHL, Nguyen TNG, et al. A Detailed
751 Protein-SELEX Protocol Allowing Visual Assessments of Individual Steps for a High
752 Success Rate. *Hum Gene Ther Methods*. 2019 Feb;30(1):1–16.
- 753 29. Ni X, Castanares M, Mukherjee A, Lupold SE. Nucleic acid aptamers: clinical applications
754 and promising new horizons. *Curr Med Chem*. 2011;18(27):4206–14.
- 755 30. Schmitz A, Weber A, Bayin M, Breuers S, Fieberg V, Famulok M, et al. A SARS-CoV-2
756 spike binding DNA aptamer that inhibits pseudovirus infection in vitro by an RBD
757 independent mechanism [Internet]. *bioRxiv*; 2020 [cited 2023 Jul 10]. p.
758 2020.12.23.424171. Available from:
759 <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.23.424171v1>
- 760 31. Le Dortz LL, Rouxel C, Leroy Q, Brosseau N, Boulouis HJ, Haddad N, et al. Optimized
761 Lambda Exonuclease Digestion or Purification Using Streptavidin-Coated Beads: Which
762 One Is Best for Successful DNA Aptamer Selection? *Methods Protoc*. 2022 Dec;5(6):89.
- 763 32. Kohlberger M, Gadermaier G. SELEX: Critical factors and optimization strategies for
764 successful aptamer selection. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022;69(5):1771–92.
- 765 33. Tolle F, Wilke J, Wengel J, Mayer G. By-Product Formation in Repetitive PCR
766 Amplification of DNA Libraries during SELEX. *PLoS ONE*. 2014 Dec 9;9(12):e114693.

II. Discussion et conclusion

La première étape a consisté à choisir la chimie de la librairie initiale, ainsi que le type de sélection. La chimie de l'ADN a été choisie pour sa stabilité et son faible coût par rapport à la librairie d'ARN (Ni et al., 2011). Nous avons décidé de réaliser le SELEX en utilisant une plateforme robotisée, développée dans le laboratoire du Pr. Gunter Mayer (Breuers et al., 2019). Cette sélection automatisée présente de nombreux avantages, elle permet de réduire considérablement le temps de sélection, ainsi que les erreurs aléatoires et opérationnelles et a été développée pour sélectionner des aptamères contre des protéines recombinantes (Breuers et al., 2019). Un SELEX contre une protéine recombinante nécessite plusieurs semaines de travail lorsqu'il est réalisé manuellement, contre seulement deux jours de sélection sur la plateforme robotisée (Breuers et al., 2019). Cette plateforme s'est ainsi montrée efficace pour la sélection d'aptamères spécifiques de la protéine Erk2, une sérine/thréonine kinase, et de la protéine de spicule (ou Spike) du SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrom coronavirus 2*) (Breuers et al., 2019 ; Schmitz et al., 2020). Cependant, cette plateforme présente également certains inconvénients. Au fur et à mesure des tours de sélection, des conditions de plus en plus stringentes doivent être appliquées pour obtenir des aptamères affins et spécifiques (ajout de compétiteurs, diminution de la concentration de la cible, augmentation des lavages...). Cependant, la plateforme robotisée ne permet pas de modifier ces paramètres au cours de la sélection. Actuellement, seuls le nombre de lavages et le nombre de cycles de PCR peuvent être modifiés, rendant difficile la réalisation d'un SELEX personnalisé et l'obtention d'aptamères hautement spécifiques pour leur cible (Breuers and Mayer, 2023). Le protocole du SELEX robotisé n'inclut également pas d'étapes de purification, après les étapes PCR et après les étapes de génération d'ADN simple brin. Or, ces étapes de purification sont essentielles pour éliminer les composants du mix PCR (amorces, dNTP...), la lambda exonucléase et pour obtenir des produits d'ADN simple brin de grande qualité (Le Dortz et al., 2022). Un autre inconvénient majeur est que l'évolution de la sélection ne peut être suivie au cours du SELEX robotisé et ne peut être observée qu'à la fin de la sélection (analyse des produits PCR sur gel obtenus à chaque tour de sélection, évaluation de l'enrichissement par séquençage NGS et/ ou par cytométrie en flux...). Au cours de notre expérience, nous avons fait face à ces principaux inconvénients. Néanmoins, le robot nous a permis d'obtenir des résultats très rapidement et de réaliser plusieurs essais dans un laps de temps très court.

Cette plateforme robotisée a été développée pour sélectionner des aptamères contre des protéines immobilisées sur des billes magnétiques, telles que des protéines couplées à des billes magnétiques Dynabeads™ His-tag isolation and pull-down. La protéine recombinante

Asp14 a été produite dans un système bactérien *E. coli*, avec 6 résidus Histidine situés à son extrémité N-terminale. Ce tag a été placé en position N-terminale, afin de ne pas impacter son domaine C-terminal. Avant la sélection, une étude préliminaire a été réalisée pour valider la conformation et la fonctionnalité de la protéine Asp14 recombinante. Il convient en effet de rappeler que la protéine Asp14 étant une invasine, elle interagit avec la surface des cellules hôtes vertébrées pour faciliter l'entrée de la bactérie. Les résultats ont montré que la protéine recombinante Asp14 était capable de se lier à la surface des cellules saines HL-60. La protéine recombinante semble donc à priori fonctionnelle.

Une première sélection automatisée a été effectuée avec un tampon de liaison, composé de PBS, de $MgCl_2$ pour stabiliser la structure secondaire des aptamères, et de BSA et d'héparine en tant que compétiteurs. Cette sélection s'est révélée infructueuse puisque peu de séquences se sont fixées sur la cible et aucun enrichissement de ces séquences n'a été observé par cytométrie en flux. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, une erreur de pipetage réalisée par le robot peut être suspectée. Cependant, aucune erreur n'a été indiquée par le logiciel et les volumes finaux récupérés étaient corrects. Nous pouvons également émettre l'hypothèse qu'une erreur a pu avoir lieu lors de l'amplification des séquences et/ou lors de la génération d'ADN simple brin, causée par une erreur lors de la préparation du mix PCR et/ou par un manque d'efficacité de la lambda exonucléase. Cependant, un contrôle qualité obligatoire a été réalisé avant de débiter la sélection et a montré que le mix était fonctionnel pour l'amplification PCR et que la lambda exonucléase utilisée était bien efficace. Ces deux hypothèses sont donc peu probables. L'échec de cette sélection semble donc être inhérent aux conditions appliquées. Le tampon de liaison utilisé contenait deux compétiteurs (BSA et héparine). Ces conditions étaient peut-être trop stringentes et ont pu conduire à l'échec du SELEX. La BSA est couramment utilisée comme compétiteur lors de SELEX réalisés sur des protéines recombinantes. Elle entre en compétition avec la protéine recombinante et seules les séquences très spécifiques des aptamères pour la cible protéique vont pouvoir se fixer sur celle-ci. Son utilisation est très bien documentée et aucune étude n'a montré un effet d'inhibition de sélection avec ce compétiteur. L'héparine reste quant à elle peu utilisée comme compétiteur lors de la sélection d'aptamères contre des cibles protéiques (Wang et al., 2019). Les billes magnétiques utilisées (Dynabeads™ His-tag isolation and pull-down) sont recouvertes de cobalt, un cation divalent, qui interagit avec les résidus histidine de la protéine. Cette charge positive peut entraîner des liaisons non spécifiques avec les séquences d'aptamères et provoquer des résultats faussement positifs (Wang et al., 2019). L'héparine, par sa charge négative, minimise cet effet, en interagissant avec la surface des billes. Cependant, la protéine Asp14 possède également une charge positive (+ 4,91) dans son domaine C-terminal (acides aminés 101 à 124) (Kahlon

et al., 2013). L'héparine peut donc également interagir avec la protéine et entrer en compétition avec les séquences au niveau de cette région. Au vu de nos résultats, il a donc été envisagé que l'ajout d'héparine comme compétiteur ait pu conduire à l'échec du SELEX.

Cette hypothèse nous a donc conduits à réaliser une nouvelle sélection en suivant les mêmes conditions mais en l'absence d'héparine dans le tampon de liaison. A la fin de la sélection, des produits PCR ont été obtenus à tous les tours de sélection et de nombreuses séquences ont donc pu se fixer à la cible. Cependant, deux types de sous-produits (« PCR-by-products ») ont également été observés : un produit PCR de haut poids moléculaire (140 pb) et un produit de type marqueur de taille, avec de nombreuses bandes de tailles supérieures à celle attendue. Ces produits peuvent être formés par l'hybridation des deux amorces et/ou par la liaison partielle des amorces aux bases complémentaires situées dans la région aléatoire des séquences. Cette liaison partielle est ensuite prolongée par la polymérase et donne des produits PCR plus longs (Kohlberger and Gadermaier, 2022). Au cours de la sélection, ces produits non spécifiques s'accumulent et peuvent dominer le pool d'ADN simple brin, entraînant l'échec du SELEX. Le contrôle de la PCR à chaque tour de SELEX et l'optimisation du nombre de cycles de PCR limitent ce phénomène (Tolle et al., 2014). Malheureusement, ces contrôles ne peuvent être appliqués lors du SELEX robotisé (Breuers et al., 2019). L'enrichissement du SELEX a ensuite été évalué par cytométrie en flux, en comparant l'affinité des bibliothèques obtenues après les tours 1, 4, 7 et 12 avec la bibliothèque initiale. Les résultats ont montré une augmentation d'affinité des bibliothèques à partir du tour 7 du SELEX. Cet enrichissement a également été observé avec les résultats NGS et a confirmé le succès de ce SELEX réalisé en l'absence d'héparine, validant notre hypothèse. Nous pouvons conclure que l'héparine a donc eu un impact négatif sur la sélection d'aptamères contre la protéine Asp14.

Les bibliothèques obtenues lors de ce SELEX ont été analysées par NGS. Les séquences ayant une fréquence d'au moins 0,004 % dans un cycle ont été sélectionnées et regroupées en familles. Une famille est composée des séquences ayant au maximum 8 mutations (insertions, substitutions...) par rapport à la séquence majoritaire au sein de la famille. Plusieurs familles partageaient de nombreux motifs communs (9 identifiés) et des structures de type tige-boucle identiques. Cette observation peut être révélatrice d'un même site de liaison reconnu par certaines séquences. Notre choix s'est porté sur la séquence majoritaire de familles les plus enrichies au cours du SELEX. Au total, 8 séquences ont donc été sélectionnées pour les études d'affinité, en raison de leur fort enrichissement (Asp14-F0, Asp14-F1, Asp14-F2, Asp14-F3, Asp14-F8, Asp14-F11, Asp14-F15 et Asp14-F17). Ces séquences ne partagent pas de motifs en commun, seules Asp14-F0 et Asp14-F2 possèdent deux nucléotides cytosine et adénine en commun aux positions 32-33.

Les études d'affinité ont été divisées en deux parties. Dans un premier temps, l'affinité des séquences a été testée contre la protéine recombinante Asp14 couplée aux billes et contre les billes non couplées. A l'heure actuelle, la plateforme robotique n'intègre pas d'étape(s) de sélection négative. Cette/ces étape(s) est/sont peuvent éviter de sélectionner des aptamères reconnaissant des protéines similaires ou le support d'immobilisation utilisé. Heureusement, les séquences choisies n'ont montré aucune affinité pour les billes seules et toutes les séquences ont montré une forte affinité contre la protéine recombinante Asp14 couplée aux billes, avec des K_d de l'ordre du nanomolaire. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat. Lors du SELEX, les billes magnétiques ont été couplées avec une quantité importante de protéine Asp14 recombinante (9,6 nmoles). Les séquences ont donc eu facilement accès à la cible protéique. Les aptamères interagissent également facilement avec les protéines chargées positivement. La charge positive portée par l'extrémité C-terminale de la protéine Asp14 a pu orienter leurs sites de liaison vers ce domaine. Nous pouvons donc nous demander si une telle attirance résulte d'une interaction spécifique ou pas. Une étude tend à invalider l'hypothèse d'une liaison non spécifique, puisqu'elle a révélé que des aptamères sélectionnés contre la protéine histone H4, chargée positivement, étaient capables de discriminer cette protéine d'autres protéines très basiques et de structure et de fonction similaire (Yu et al., 2011). Dans notre cas, nous avons testé l'affinité des aptamères en présence d'héparine, chargée négativement. L'affinité a considérablement diminué pour l'ensemble des séquences. En présence d'héparine, aucune affinité a été observée pour les séquences Asp14-F1 et Asp14-F3. Nous pouvons ainsi supposer que ces aptamères reconnaissent probablement une partie du domaine C-terminal. Au contraire, la présence d'héparine a certes diminué l'affinité pour les séquences Asp14-F8, Asp14-F11, Asp14-F15 et Asp14-F17, mais leur affinité était toujours supérieure à celle du scramble. Nous pouvons donc supposer que ces séquences peuvent se fixer sur une autre région de la protéine et/ou se fixer sur le domaine C-terminal avec une très grande affinité.

Dans un second temps, il a été nécessaire de s'assurer que les séquences sélectionnées étaient capables de reconnaître la protéine exprimée à la surface d'*A. phagocytophilum*. La séquence en acides aminés de la protéine recombinante utilisée a été identifiée dans une étude réalisée par Kahlon *et al.* (2013), à partir de formes DC de la souche humaine américaine NCH-1 d'*A. phagocytophilum*. Cette souche n'étant pas disponible dans notre laboratoire, nous avons testé les séquences contre une suspension enrichie en *A. phagocytophilum* à partir de cellules HL-60 infectées par la souche NY18, une autre souche humaine américaine. La séquence nucléotidique de la protéine Asp14 a été amplifiée par PCR et séquencée à partir des cellules HL-60 NY18 et est identique à la séquence de la protéine Asp14 de la souche NCH-1. Nous pouvons donc raisonnablement supposer que la souche

NY18 exprime également la protéine Asp14 à sa surface. Les résultats en microscopie confocale ont montré que deux aptamères candidats n'ont pas pu se lier à la suspension enrichie (Asp14-F0 et Asp14-F17). Ces aptamères semblent ne pas reconnaître la protéine exprimée à la surface bactérienne, leur site de liaison peut être situé dans une région qui n'est pas accessible aux aptamères (partie membranaire), ou bien leur site de liaison implique une séquence protéique qui n'est pas exprimée chez la souche NY18. Pour les autres séquences, une forte affinité a été observée avec la suspension enrichie en *A. phagocytophilum*. Ces aptamères semblent reconnaître la protéine Asp14 à la surface bactérienne.

La suspension enrichie en *A. phagocytophilum* obtenue à partir de cellules HL-60 NY18 a été incubée avec les aptamères puis utilisée pour infecter des cellules HL-60 et l'affinité a été observée après 4 h d'incubation par microscopie confocale. L'objectif de cette expérience était de vérifier indirectement, par une approche en lien avec la cinétique d'infection, que les aptamères reconnaissent les formes DC. Seules les formes DC sont capables d'envahir et d'infecter les cellules hôtes de mammifères. Dans les 4h suivant l'adhésion, les organismes DC entrent dans les vacuoles des cellules hôtes (Troese et al., 2011). La protéine Asp14 est surexprimée à ce moment de l'infection dans les cellules HL-60 NCH-1 (Kahlon et al., 2013). Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux de l'expérience précédente. A l'exception des séquences Asp14-F0 et Asp14-F17, tous les aptamères ont été capables de se lier à leur cible présente dans la suspension enrichie et d'envahir les cellules HL-60. Cette liaison montre que les aptamères semblent reconnaître Asp14 présente à la surface des formes DC de la souche NY18 d'*A. phagocytophilum*.

Afin de confirmer que les aptamères sélectionnés reconnaissent bien la protéine Asp14, il serait nécessaire de confirmer par Western Blot l'expression de la protéine Asp14 dans la suspension enrichie. Les aptamères sélectionnés peuvent être utilisés comme outils de détection de la protéine Asp14. Cependant, les aptamères peuvent ne pas reconnaître leur cible protéique après migration sur gel. La détection peut se réaliser avec un sérum polyclonal préparé contre la protéine Asp14 recombinante (Kahlon et al., 2013). Il est également possible que les aptamères sélectionnés reconnaissent une protéine similaire à Asp14 et non Asp14 elle-même. Il serait intéressant de tester l'affinité de ces aptamères contre d'autres protéines membranaires d'*A. phagocytophilum*, telles que OmpA ou AipA. La prochaine étape à réaliser est donc de confirmer que leur cible correspond bien Asp14, par Western Blot ou par SDS-PAGE après la capture de la cible sur des billes couplées aux aptamères.

Les aptamères spécifiques d'Asp14 représentent une réelle opportunité pour proposer de nouveaux outils pour le traitement de l'infection par *A. phagocytophilum*. Dans une étude précédente, l'incubation de formes DC d'*A. phagocytophilum* (souche humaine américaine

NCH-1) avec un sérum polyclonal dirigé contre la protéine recombinante GST-Asp14 (Glutathion-S-transférase) a permis de réduire l'infection de 37% dans les cellules HL-60 (*human promyelocytic leukemia cells*) (Kahlon et al., 2013). Un sérum polyclonal dirigé contre le domaine C-terminal de la protéine Asp14 a également permis de réduire d'environ 50% l'infection des cellules HL-60 (Seidman et al., 2015). Enfin, un cocktail d'anticorps polyclonaux dirigés contre les différents domaines des trois protéines Asp14, OmpA et AipA qui sont impliqués dans l'invasion cellulaire a réduit l'infection d'environ 80% dans les cellules HL-60 (Naimi et al., 2020). Il serait donc intéressant d'observer l'effet antibactérien des aptamères sélectionnés pour ouvrir la voie à une approche thérapeutique innovante sans antibiotiques.

Outre son potentiel thérapeutique, la protéine Asp14 présente également un grand intérêt pour la recherche et le diagnostic. Sa localisation à la surface des formes DC et son expression chez les humains et la souris lors d'une infection par *A. phagocytophilum* en font une cible particulièrement intéressante pour le développement d'une méthode de capture de la bactérie au sein d'échantillons sanguins. Elle pourrait permettre d'améliorer l'isolement et la culture d'*A. phagocytophilum*, ainsi que la sensibilité des méthodes de détection actuelles. Les aptamères se sont montrés particulièrement efficaces pour le développement de méthodes de capture de nombreuses bactéries, à partir de diverses matrices (sérum, produits alimentaires, environnement...) (Joshi et al., 2009; Davydova et al., 2015; Afrasiabi et al., 2020). Par exemple, pour capturer les bactéries dans le sang, des nanoparticules de silice ont été couplées avec des aptamères sélectionnés et spécifiques de *Staphylococcus aureus*. L'efficacité de cette méthode était de 78% dans une solution PBS et de 61% dans du sang total, contenant 10^2 CFU/mL. Des aptamères ont également été conjugués à des nanoparticules magnétiques recouvertes de dioxyde de titane et utilisés pour capturer *S. aureus* ou *Escherichia coli* dans le sang avec une efficacité d'enrichissement élevée (80%) (Sorgenfrei et al., 2022). Cependant, l'utilisation d'aptamères spécifiques de la protéine Asp14 pour le diagnostic doit être très prudente, car deux régions protéiques conservées situées entre les acides aminés 19-61 et 101-115 sont identiques à celles présentes chez *A. marginale*, chez *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis* et *E. ruminantium* (Kahlon et al., 2013). Il serait nécessaire de tester ces aptamères contre ces autres bactéries pathogènes intracellulaires, afin d'étudier leur spécificité et leur capacité à accroître la sensibilité du diagnostic de l'anaplasmose granulocytaire.

Afin d'obtenir des aptamères contre *A. phagocytophilum*, une deuxième approche a été développée et a consisté à sélectionner des aptamères contre une protéine exprimée à la membrane bactérienne. La protéine Asp14 est apparue comme une cible prometteuse, en raison de son expression à la surface des formes infectieuses et de son domaine C-terminal, potentiellement accessible aux aptamères. La sélection d'aptamères a été réalisée contre la protéine Asp14 recombinante, par un SELEX robotisé développé par l'équipe de recherche du Pr. Gunter Mayer. Ce SELEX nous a permis de montrer pour la première fois l'effet (potentiellement) négatif de l'héparine en tant que compétiteur sur la sélection d'aptamères contre une protéine portant un domaine chargé positivement. En l'absence d'héparine dans le tampon de liaison, 8 séquences ont été sélectionnées et ont montré une forte affinité contre la protéine Asp14 recombinante, avec des K_d de l'ordre du nanomolaire. Parmi ces 8 séquences, 6 d'entre elles semblent reconnaître leur cible dans le modèle cellulaire HL-60 NY18, qui semble correspondre à la protéine Asp14 exprimée à la surface bactérienne. Ces premiers résultats sont prometteurs et constituent une première étape pour obtenir des aptamères contre *A. phagocytophilum* et permettent d'envisager diverses applications issues de l'obtention d'aptamères spécifiques d'Asp14.

Discussion générale et perspectives

Les tiques transmettent une grande variété d'agents infectieux (bactéries, parasites et virus), notamment en raison de leurs interactions possibles avec des hôtes vertébrés différents au cours de leur cycle de vie (Madison-Antenucci et al., 2020) et de la multiplicité des espèces hôtes sur lesquels elles peuvent se nourrir, notamment pour les tiques appartenant au genre *Ixodes*. L'incidence des maladies vectorisées par les tiques ainsi que les cas d'émergence sur de nouveaux territoires sont en constante augmentation depuis le début du 20^{ème} siècle, principalement en raison des activités humaines, qui perturbent les écosystèmes (Madison-Antenucci et al., 2020). Les humains et les animaux interagissent à des interfaces toujours plus nombreuses, créant de nouvelles opportunités pour la transmission d'agents de maladies zoonotiques, y compris les maladies vectorisées par les tiques. Parmi elles, l'anaplasmose granulocytaire est une maladie avec un impact clinique important sur la santé humaine et animale, causée par la bactérie *A. phagocytophilum*. En Europe, cette bactérie est à l'origine d'importantes pertes économiques au sein des élevages, en provoquant des avortements, des chutes de production, en particulier des agalaxies (chutes de la production laitière), voire la mort de certains animaux (Stuen, 2007). En outre, cette espèce, telle qu'elle est définie actuellement, a la particularité d'infecter un très large spectre d'hôtes vertébrés (animaux domestiques, faune sauvage...). *A. phagocytophilum* infecte majoritairement les granulocytes neutrophiles des hôtes vertébrés et se caractérise par un cycle de développement intracellulaire strict. Elle se multiplie au sein d'une vacuole cytoplasmique dans la cellule hôte et emploie des stratégies uniques pour assurer sa survie intracellulaire, surtout s'agissant de cellules à vocation phagocytaire. Cependant, de nombreuses questions de recherche restent sans réponse. Comment expliquer les différences de pathogénicité entre les souches humaines européennes et américaines ? Quels sont les réservoirs des souches zoonotiques et des souches affectant les ruminants en Europe ? Quelles sont les molécules impliquées dans les interactions entre la bactérie et ses hôtes vertébrés/invertébrés ? C'est dans ce contexte que le groupe VAMP (vecteurs et agent microbiens pathogènes) cherche à élucider les interactions hôtes-vecteurs-agents pathogènes, encore peu connues. Cependant, les difficultés liées à l'isolement et à la culture d'*A. phagocytophilum* confrontent les chercheurs à de nombreux défis et complexifient son étude. Les outils moléculaires, en particulier les anticorps monoclonaux susceptibles de permettre d'étudier la bactérie et ses interactions moléculaires dans les modèles cellulaires, sont actuellement inexistantes ou non disponibles commercialement pour la communauté scientifique.

La visée principale de cette thèse était donc de proposer de nouveaux outils pour l'étude d'*A. phagocytophilum*. Les aptamères sont apparus comme des outils innovants et prometteurs, en raison des avantages significatifs qu'ils présentent en comparaison aux anticorps monoclonaux et de leurs nombreuses applications potentielles en infectiologie. Des aptamères ont été développés pour lutter contre les maladies vectorisées par les tiques (Vivekananda and Kiel, 2006; Lamont et al., 2014; Jalali et al., 2021). Par exemple, un aptamère a permis la détection de la protéine OspA (*outer surface protein A*) à partir du sérum de patients infectés par l'agent responsable de la maladie de Lyme (Tabb et al., 2022). Au vu de ses nombreux avantages, la technologie de production des aptamères a été choisie pour développer de nouveaux outils d'étude pour *A. phagocytophilum*.

A. phagocytophilum est toutefois considérée comme une cible complexe et difficile pour les aptamères, principalement en raison de sa localisation intracellulaire stricte et de l'impossibilité d'obtenir des bactéries purifiées. En effet, sa purification à partir de cellules infectées s'accompagne inévitablement de la présence de composants provenant de la cellule hôte. En outre, très peu d'études ont sélectionné des aptamères contre des cibles intracellulaires et une seule étude a mentionné la sélection d'aptamères contre des bactéries intracellulaires strictes (Javaherian et al., 2009; Bruno et al., 2016). Pour l'ensemble de ces raisons, ce projet était un vrai défi. Pour augmenter nos chances d'obtenir des aptamères contre *A. phagocytophilum*, deux approches ont été développées. La première approche a consisté à sélectionner des aptamères contre une suspension enrichie en *A. phagocytophilum*, obtenue à partir de cellules HL-60 infectées par la souche humaine américaine NY18. Elle sera nommée « Complex-SELEX », dans cette discussion. La seconde approche avait pour objectif de sélectionner des aptamères contre la protéine Asp14, située à la surface d'*A. phagocytophilum*. Le SELEX a été réalisé contre la protéine Asp14 recombinante *via* une plateforme automatisée. On nommera cette sélection « Protein-SELEX ». Chacune de ces deux approches a nécessité une méthode spécifique de sélection et les résultats obtenus ouvrent la voie vers de futures potentielles applications (**Tableau 7**). Forts de l'expérience acquise dans le développement de ces deux méthodes de sélection appliquées à un même objet d'étude, *A. phagocytophilum*, cette discussion a pour objectif de confronter ces deux approches.

Tout d'abord, des stratégies différentes ont été élaborées pour ces deux SELEX. La sélection d'aptamères contre une suspension enrichie en bactéries offre la possibilité d'obtenir des aptamères contre les deux formes de la bactérie (formes répliquative et infectieuse) mais également contre des molécules cellulaires ou bactériennes exprimées au cours de l'infection des cellules cibles par *A. phagocytophilum*. Ainsi, de nouvelles molécules pourraient être

identifiées et utilisées pour développer de nouveaux outils de lutte et/ou de diagnostic/dépistage. Dans le cas de la sélection contre la protéine Asp14, l'objectif était d'obtenir des aptamères spécifiques d'*A. phagocytophilum*, rendant plus plausible le développement d'une méthode de capture de la bactérie à des fins de recherche et/ou de diagnostic/dépistage.

D'un point de vue technique, la sélection réalisée contre la suspension enrichie en *A. phagocytophilum* était très complexe, puisqu'une variété de cibles était accessible aux aptamères. La mise au point de ce SELEX au sein de notre laboratoire a nécessité plusieurs mois d'optimisation. La première étape de cette optimisation a consisté en la mise en place d'une méthode de purification d'*A. phagocytophilum* à partir de cellules infectées pour obtenir une suspension enrichie en bactéries avec peu de débris cellulaires. La seconde étape a eu pour objectif d'optimiser les étapes critiques du SELEX, à savoir l'amplification de la librairie par PCR et la génération d'ADN simple brin. Pour le choix de la méthode optimale de génération d'ADN simple brin, nous nous sommes heurtés à un manque de données dans la littérature. Un travail de comparaison approfondi des deux méthodes les plus utilisées a été réalisé et a démontré la supériorité de la méthode de digestion par la lambda exonucléase. Ces optimisations étaient indispensables puisque ces étapes critiques conditionnaient la probabilité de succès du futur SELEX. Après ces optimisations, le SELEX a pu débuter. Malgré l'optimisation de la méthode de purification d'*A. phagocytophilum*, la suspension obtenue contenait inévitablement des éléments des cellules hôtes (débris, protéines...). Le SELEX était donc associé à un risque élevé de sélectionner des aptamères contre des molécules cellulaires exprimées en situation ou non d'infection. Plusieurs stratégies ont été mises en place au cours de la sélection pour limiter ce risque (sélection négative réalisée contre un lysat de cellules saines, SELEX contrôle...). L'évolution du SELEX a été suivie par PCR quantitative et par analyse NGS, ce qui a permis d'adapter les conditions au fur et à mesure de la sélection. Au total, 12 tours de sélection ont été réalisés. Ce SELEX a été un processus long et fastidieux, puisqu'un tour de sélection était réalisable en une semaine et était tributaire de la culture cellulaire, c'est-à-dire de l'état des cellules et de leur niveau d'infection, sachant que 3 à 4 jours de culture sont nécessaires pour obtenir des cellules HL-60 infectées par la souche NY18. Cependant, l'ensemble des optimisations réalisées et les stratégies choisies ont permis d'appliquer un protocole optimal et très adaptable.

La sélection d'aptamères contre une protéine recombinante est une méthode jugée plus rapide et moins complexe, la sélection étant réalisée contre une cible unique et purifiée. Dans notre cas, ce SELEX a été réalisé *via* une plateforme robotisée mise en place par l'équipe du Pr. Gunter Mayer (Université de Bonn, Allemagne). Cette plateforme a été spécialement

développée pour sélectionner rapidement des aptamères contre des cibles purifiées. Cette méthode de sélection a demandé beaucoup moins d'optimisations, puisque le protocole de sélection avait déjà été mis en place par l'équipe de recherche de Bonn. Cependant, ce protocole est qualifié de « quick and dirty » (Breuers and Mayer, 2023). L'évolution du SELEX ne peut être suivie et modulée et un nombre standardisé de cycles PCR est employé. De même les étapes de purification au cours de la sélection sont absentes (Breuers and Mayer, 2023). L'importante quantité de produits PCR non spécifiques que nous avons obtenues illustre bien cette absence de maîtrise des paramètres/conditions techniques et a confirmé l'importance d'optimiser le nombre de cycles d'amplification PCR au cours de la sélection. De plus, certains paramètres comme la durée d'incubation, la concentration en cibles... ne peuvent pas être modifiés au cours du SELEX automatisé et il n'est pas possible de réaliser d'étape de sélection négative, notamment contre les billes utilisées comme support. Les conditions appliquées sont donc peu stringentes et rendent aléatoire la sélection d'aptamères très affins et spécifiques. Ce protocole est donc très peu adaptable et reste limité à des cibles purifiées. Cependant, son utilisation est très rapide, une sélection composée de 12 tours ayant nécessité 2 jours de contrôle qualité et 2 jours de sélection sur la plateforme robotisée. Elle permet donc de tester rapidement des cibles protéiques, et de réaliser plusieurs essais dans un laps de temps très court. Au total, quatre tentatives ont été faites puisqu'il a été nécessaire d'optimiser le tampon de liaison. Cette sélection a nécessité deux mois de travail durant lesquels j'ai séjourné dans le laboratoire de Bonn et réalisé l'intégralité des essais.

Les deux approches développées ont apporté des résultats différents que nous pouvons comparer en termes de diversité des séquences analysées par NGS, ainsi que d'affinité et de spécificité des aptamères sélectionnés. Les principaux résultats et les points soulevés sont discutés ci-après.

Pour le « Complex-SELEX », peu de structures communes entre les séquences enrichies ont été mises en évidence par NGS. Au contraire, pour le « Protein-SELEX », plusieurs séquences partageaient des structures et/ou des motifs communs. Au total, neuf motifs différents ont été mis en évidence pour ce SELEX. Le « Complex-SELEX » a conduit à des structures plus diverses, en cohérence avec le fait qu'une variété de cibles était disponible, contrairement au « Protein-SELEX » où les cibles potentielles étaient limitées et correspondaient soit à la protéine Asp14 recombinante soit aux billes magnétiques utilisées comme support. L'analyse NGS nous a également permis de choisir les candidats aptamères les plus prometteurs. Les séquences les plus enrichies sont regroupées en familles, selon leur similitude nucléotidique. Une famille est composée de plusieurs séquences ayant au maximum huit mutations par rapport à la séquence la plus fréquente au sein de la famille. Dans les deux cas, nos critères

de sélection se sont portés sur des familles très abondantes et avec un score d'évolution important. Pour chaque famille, nous avons décidé de choisir la séquence la plus fréquente. Cette stratégie est couramment utilisée dans la littérature (Quang et al., 2016). Nous sommes conscients qu'en appliquant cette stratégie, nous sommes potentiellement passés à côté de séquences certes faiblement enrichies mais susceptibles d'être dotées d'une affinité plus élevée pour la cible. Par manque de temps, nous avons restreint notre étude aux séquences les plus enrichies. Dans le cas du « Protein-SELEX », huit séquences ont été choisies pour les études d'affinité, en raison de leur abondance et de leur enrichissement important (Asp14-F0, Asp14-F1, Asp14-F2, Asp14-F3, Asp14-F8, Asp14-F11, Asp14-F15 et Asp14-F17). Dans le cas du « Complex-SELEX », les résultats NGS ont été comparés avec ceux obtenus pour le SELEX contrôle. Cette stratégie nous a permis d'éliminer des séquences plus fréquentes dans le SELEX contrôle. En appliquant cette stratégie, nous avons pu sélectionner quatre séquences (Apta-F0, Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10), caractérisées par un enrichissement important et spécifique.

L'affinité des candidats aptamères a ensuite été caractérisée, par la mesure de leur K_d . La sélection réalisée contre la suspension enrichie en bactéries nous a permis d'obtenir trois aptamères (Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10) capables de reconnaître les cellules HL-60 NY18 avec une grande affinité (K_d de l'ordre du nanomolaire). En outre, aucune affinité n'a été observée contre les cellules saines HL-60. Ce résultat positif a donc confirmé l'efficacité du « Complex-SELEX » réalisé. Pour le « Protein-SELEX », l'ensemble des séquences testées ont montré une affinité élevée pour la protéine Asp14 recombinante, avec des K_d obtenus de l'ordre du nanomolaire également. Cette affinité de liaison semble être restreinte à la protéine recombinante, puisqu'aucun marquage n'a été observé contre les billes magnétiques utilisées comme support. Ce résultat est très étonnant, puisque nous avons observé la présence importante de produits PCR non spécifiques lors du SELEX automatisé. Par conséquent, nous nous attendions à obtenir un certain nombre de séquences parasites, c'est-à-dire sans affinité pour la cible mais qui se sont tout de même enrichies au cours de la sélection. De par leur charge négative, les aptamères peuvent interagir facilement avec les protéines basiques, par des interactions électrostatiques (Drees et al., 2023). La protéine Asp14 entière possède une charge neutre (point isoélectrique de 6) mais son domaine C-terminal est chargé positivement (Kahlon et al., 2013). Nous nous sommes donc demandés si une telle affinité observée résultait ou non d'une interaction non spécifique au niveau de ce domaine. Les tests d'affinité en présence d'héparine comme compétiteur nous ont conduit à envisager que certaines séquences seraient peu spécifiques de la protéine Asp14 recombinante (Asp14-F1 et Asp14-F3). Cependant, plusieurs points restent à éclaircir : où se situe précisément le site de liaison de ces aptamères sur la protéine recombinante ? Ces aptamères peuvent-ils

également interagir avec une autre protéine basique, de manière non spécifique ? Pour identifier leur site de liaison, il serait intéressant de tester l'affinité de ces aptamères contre la protéine Asp14 tronquée, dépourvue de son domaine C-terminal qui se situe entre les résidus 101 à 124. Le site de liaison peut également être étudié par modélisation informatique de l'interaction de la liaison aptamère-cible (Adachi and Nakamura, 2019; Poolsup et al., 2023). Pour cela, une modélisation de la structure tertiaire des aptamères et de la protéine est nécessaire pour tenter de prédire plusieurs sites de liaison possibles. Ces logiciels restent très peu utilisés dans la recherche sur les aptamères, en partie parce que ces programmes ne fournissent souvent pas une prédiction unique mais donnent de nombreuses possibilités (Adachi and Nakamura, 2019). La cristallographie à rayons X peut aussi fournir des informations très détaillées sur les interactions et apporte une connaissance approfondie du mode de liaison aptamère-cible (Ruigrok et al., 2012). Cependant, cette technique nécessite de l'expertise dans ce domaine et de nombreuses optimisations (ratio concentration aptamère et protéine, qualité et pureté...). Seules quelques structures co-cristallines (aptamère et protéine) sont actuellement disponibles (Ruigrok et al., 2012). Des tests d'affinité sur la protéine Asp14 tronquée seraient plus faciles à mettre en place et permettraient d'obtenir rapidement des informations sur le site de liaison. Enfin, pour étudier la spécificité des aptamères vis-à-vis de la protéine Asp14 recombinante, il serait intéressant de tester leur affinité contre une autre protéine de structure similaire également dotée d'une charge positive au sein de sa séquence. La protéine AptA est située à la surface d'*A. phagocytophilum* et des vacuoles cytoplasmiques. Elle possède une charge positive avec un point isoélectrique de 10,25 (Sukumaran et al., 2011). Elle serait donc particulièrement intéressante à tester pour définir la spécificité ou non de nos aptamères contre la protéine Asp14 recombinante.

La spécificité des aptamères obtenus par les deux approches a ensuite été étudiée par microscopie confocale. Pour les deux projets, nous avons fait face à une difficulté majeure, celle de marquer *A. phagocytophilum* dans les cellules HL-60 NY18 et dans les cellules de tiques ISE6 NY18 ou ISE6 NV2Os. Le CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) a pu être utilisé comme marqueur d'*A. phagocytophilum* dans les cellules HL-60 NY18. Cependant, il nous a été impossible de marquer les cellules de tiques infectées, en raison de leur cinétique d'infection. L'infection des cellules de tiques par *A. phagocytophilum* nécessite une à deux semaines, alors que le CMFDA n'est stable que 72h. Nous pouvons également questionner la sensibilité d'un tel marquage, puisque seules les bactéries métaboliquement actives sont marquées au CMFDA. De ce fait, il nous a été très difficile pour les deux projets de tirer des conclusions certaines quant à une reconnaissance d'*A. phagocytophilum* par les aptamères obtenus.

Pour le « Complex-SELEX », les études de microscopie confocale ont mis en évidence un marquage intracellulaire par les aptamères Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10 dans les cellules HL-60 NY18. Un tel marquage soulève de nombreuses questions. Les aptamères sont-ils internalisés par endocytose dans la cellule, suite à leur liaison à un récepteur présent à la surface des cellules infectées ? Ou bien les aptamères peuvent-ils entrer dans les cellules infectées en raison de la fragilité de leur membrane causée par l'infection et ainsi reconnaître leurs cibles intracellulaires ? Deux voies d'endocytose sont principalement impliquées dans l'internalisation des aptamères après leur liaison à un récepteur situé à la surface de la membrane cellulaire (Alamudi et al., 2021). Il s'agit de l'endocytose impliquant des vésicules de clathrine ou de cavéoline qui assurent ensuite le transport des aptamères jusqu'aux endosomes. La macropinocytose, une autre voie d'endocytose, est également impliquée dans l'internalisation d'aptamères spécifiques de la nucléoline, une protéine de surface (Alamudi et al., 2021). Cette voie n'implique pas de récepteur cellulaire et les macropinosomes sont ensuite soit recyclés à la surface cellulaire pour libérer leur cargaison, soit acheminés vers le lysosome. Pour tester l'hypothèse d'une internalisation par endocytose, nous avons testé les aptamères sélectionnés contre les cellules infectées à une température de 4°C. A cette température, les voies d'endocytose sont considérées comme inactivées. Nous avons observé un marquage intracellulaire à cette température, ces premiers résultats tendent donc à invalider l'hypothèse d'une internalisation impliquant une voie d'endocytose par reconnaissance d'un récepteur et/ou d'une protéine de surface. Les aptamères sélectionnés semblent donc pouvoir rentrer dans les cellules infectées naturellement perméabilisées par l'infection par *A. phagocytophilum* et atteindre leurs cibles intracellulaires. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces premiers résultats. Il serait intéressant d'utiliser des inhibiteurs chimiques spécifiques des possibles voies d'endocytose comme le dextran (inhibiteur de la macropinocytose) ou encore le dynasore (inhibiteur de l'endocytose médiée par la dynamine)... (Alamudi et al., 2021). Comme mentionné plus haut, les études au microscope confocal n'ont pas permis de conclure quant à une potentielle reconnaissance d'*A. phagocytophilum* par ces aptamères, malgré les études de colocalisation réalisées. Afin d'étudier précisément la localisation d'Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10 dans les cellules infectées, il serait intéressant d'utiliser des marqueurs spécifiques des organites intracellulaires (endosomes, réticulum endoplasmique...). En outre, au laboratoire, nous possédons un anticorps capable de reconnaître la protéine bécline-1, une protéine cellulaire retrouvée sur la membrane des vacuoles cytoplasmiques contenant *A. phagocytophilum*. L'utilisation de ces marqueurs en microscopie confocale pourra permettre de mettre en évidence une localisation ou non des aptamères au niveau de ces structures intracellulaires et d'apporter des informations supplémentaires sur la localisation de leurs cibles. Nous avons également pu montrer que les trois aptamères obtenus reconnaissaient des protéines

exprimées à différents temps d'infection et que Apta-F8 était capable de reconnaître sa cible dans des cellules de tiques infectées par la souche humaine américaine ISE6 NY18 ou ISE6 NV2Os.

L'une des limites principales du « Protein-SELEX » est que les aptamères sélectionnés contre la protéine recombinante peuvent ne pas reconnaître la protéine exprimée dans son système cellulaire. Cette observation est d'autant plus vraie pour les protéines membranaires. En effet, en raison de leur inclusion membranaire, certains sites de liaisons peuvent ne plus être accessible aux aptamères sélectionnés. Ce risque pouvait être limité en effectuant un Cross-SELEX, c'est-à-dire en réalisant des tours de sélection à la fois sur la protéine recombinante et sur la protéine exprimée dans son système cellulaire (Mallikaratchy, 2017). Dans notre cas, cette stratégie aurait été intéressante à mettre en place a priori mais nous avons identifié certains obstacles. Avec cette stratégie, les aptamères auraient été incubés avec la protéine Asp14 recombinante puis avec une suspension enrichie en bactéries obtenue à partir de cellules infectées. Cependant, cette suspension contient de nombreuses cibles potentielles (protéines cellulaires, débris, ADN génomique...). Cette stratégie aurait donc été associée à un risque très élevé de sélectionner des aptamères contre des molécules de la cellule hôte. Il aurait été nécessaire de mettre en place une sélection négative contre un lysat de cellules saines, comme pour la première approche. Cette stratégie nous a paru très complexe et fastidieuse. Pour ces raisons, nous n'avons pas réalisé de Cross-SELEX. Les aptamères sélectionnés par le robot ont été testés sur une suspension enrichie en bactéries obtenue à partir de cellules HL-60 NY18. Parmi les huit séquences testées, six ont reconnu leur cible dans la suspension bactérienne enrichie. Cependant, l'expression de la protéine Asp14 n'a pas été confirmée dans le modèle d'infection HL-60 NY18. Dans la littérature, cette protéine a été mise en évidence à la surface des formes denses de la souche humaine américaine NCH- 1 (Kahlon et al., 2013). La protéine Asp14 semble tout de même être exprimée chez de nombreuses souches d'*A. phagocytophilum*, y compris issues d'espèces très différentes et obtenues dans des régions du monde très éloignées, or NCH-1 et NY18 sont toutes deux des souches humaines des Etats-Unis. Pour une interprétation rigoureuse des résultats, il serait cependant indispensable de confirmer l'expression de cette protéine dans les cellules HL-60 NY18 par Western Blot. Ces premiers résultats de spécificité semblent tout de même très encourageants puisque six séquences ont reconnu leur cible, présente sur les formes infectieuses de la souche NY18 d'*A. phagocytophilum*.

En perspective, des études supplémentaires sont indispensables pour mieux caractériser la spécificité des aptamères obtenus. Pour le « Complex-SELEX » et le « Protein-SELEX », d'autres souches d'*A. phagocytophilum* cultivées en laboratoire pourront être testées (souche européenne bovine BV-49 et/ou souche européenne de chevreuil RD10 cultivées dans des

cellules de tiques IRE/CTVM20 (IRE20)). La souche bovine BV-49 cultivée dans les cellules de tiques IRE20 sera à privilégier pour les aptamères sélectionnés contre Asp14 puisque cette protéine est exprimée dans le génome d'une souche similaire déjà séquencée, la souche bovine BOV_10179. Ces études nous permettront de dresser un profil de spécificité plus large des aptamères vis-à-vis de différents modèles d'infection d'*A. phagocytophilum*.

Pour le « Complex-SELEX », nous avons mis en évidence que les aptamères Apta-F4 et Apta-F10 reconnaissent leurs cibles protéiques respectives uniquement dans le modèle HL-60 NY18. Leurs cibles potentielles pourraient être des protéines exprimées par la cellule HL-60 en cas d'infection non spécifique à *A. phagocytophilum*. Pour tester cette hypothèse, il serait pertinent d'étudier l'affinité de ces aptamères contre des cellules HL-60 infectées par d'autres agents infectieux, comme *Chlamydia trachomatis* (Bard et al., 1987). Même si ces agents pathogènes se cultivent sur des cellules HL-60 en état de différenciation vers des neutrophiles cela permettra tout de même de tester cette hypothèse.

Enfin, d'autres bactéries intracellulaires strictes du genre *Anaplasma* pourront être testées vis-à-vis des deux approches, notamment *Anaplasma ovis* qui peut se cultiver en cellules HL-60 et *Anaplasma marginale*, pouvant être cultivée en cellules de tiques ISE6 (Atif, 2015; Wei et al., 2017). Pour l'approche Asp14, il serait également très pertinent d'étudier l'affinité de ces aptamères contre *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis* et/ou *E. ruminantium* puisque la protéine Asp14 possède des régions conservées avec ces espèces (Kahlon et al., 2013). Ces essais permettront également d'identifier ou non si leur site de liaison implique les régions conservées.

L'identification de la cible des aptamères Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10 est une autre perspective essentielle pour définir s'il s'agit d'une protéine située à la surface ou sécrétée par *A. phagocytophilum* ou d'une protéine cellulaire exprimée au cours de l'infection. La méthode de choix se base sur la capture de la cible par l'aptamère étudié, suivie de son élution, de sa migration sur gel d'électrophorèse et de son identification par spectrométrie de masse. Cependant, cette méthode reste très difficile à mettre en œuvre puisque la quantité de protéines extraites est souvent très faible, ce qui rend complexe l'identification précise des protéines par spectrométrie de masse (Hou et al., 2015). Nous avons rencontré ce problème lors d'une première tentative d'identification de la cible des aptamères Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10. Des pistes d'optimisation ont pu être proposées et pourront être appliquées lors des prochains essais. Dans le cas des aptamères sélectionnés contre la protéine Asp14 recombinante, cette identification serait éventuellement intéressante pour confirmer la spécificité des aptamères vis-à-vis de la protéine Asp14, située à la surface

d'*A. phagocytophilum*. Cette prochaine étape d'identification conditionnera les applications futures des aptamères obtenus, en recherche, en diagnostic et/ou en thérapeutique.

Les aptamères sélectionnés pourront constituer de nouveaux outils d'étude pour *A. phagocytophilum* et peuvent améliorer la recherche, à travers deux principaux axes de développement. Premièrement, ces aptamères offrent la possibilité de mieux comprendre les interactions entre la bactérie et ses hôtes. L'identification des cibles reconnues par Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10 permettra de déterminer si ces cibles correspondent à des protéines connues ou inconnues et de pouvoir explorer leur rôle dans l'infection. De nouvelles molécules à l'interface *A. phagocytophilum*/cellules pourront ainsi être identifiées. Ces aptamères pourraient être également très intéressants pour étudier les mécanismes d'infection communs ou non entre la bactérie et les cellules vertébrées *versus* invertébrées. Apta-F8 reconnaît une protéine exprimée à la fois dans les modèles d'infection vertébré et invertébré. Au contraire, Apta-F4 et Apta-F10 sont spécifiques du modèle cellulaire vertébré utilisé HL-60 NY18 ou des modèles vertébrés plus généralement. En outre, les aptamères spécifiques d'*A. phagocytophilum* pourront être utilisés à des fins de culture et/ou de génomique, en développant une méthode de capture de la bactérie à partir de prélèvements sanguins et/ou d'autres natures (par exemple à partir des tissus ou sécrétions génitaux de ruminants ayant avorté). Cette méthode de capture facilitera l'isolement et la mise en culture des souches circulantes, permettant d'augmenter le nombre de souches d'*A. phagocytophilum* disponibles en laboratoire. De ce fait, un plus grand nombre de génomes pourront être séquencés, en vue de comparer les souches à des fins phylogénétiques et/ ou de typage. Ces études permettront *in fine* de mieux comprendre la variabilité génétique observée et les différences de pathogénicité/virulence entre les souches.

Cette méthode de capture offre également la possibilité d'améliorer la sensibilité des méthodes de diagnostic actuelles de l'anaplasmose granulocytaire, qui souffrent pour la plupart d'un manque de sensibilité puisque la charge bactérienne est souvent faible dans les prélèvements. Cette méthode d'enrichissement couplée à une détection par PCR permettra de concentrer les bactéries dans un faible volume et d'améliorer la sensibilité de détection (Sande et al., 2020). Une étude précédente a démontré l'efficacité d'une méthode de capture de *Campylobacter jejuni* avec des aptamères conjugués à des billes magnétiques couplées à de la streptavidine suivie d'une détection par PCR (Suh et al., 2014). En suivant ce même principe, nous avons réalisé un premier essai *in vitro* à partir de cellules infectées HL-60 NY18, en utilisant les aptamères Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10. Ces premiers essais ont été non concluants mais ont été réalisés en partant de l'hypothèse que ces aptamères reconnaissent une protéine d'*A. phagocytophilum*. L'identification de leur cible est donc primordiale avant de développer cette méthode de capture. Les aptamères spécifiques d'Asp14 semblent être très

pertinents pour le développement d'une telle méthode, étant donné que cette protéine se situe à la surface des formes infectieuses d'*A. phagocytophilum*. Cependant, cette protéine possède des régions conservées avec d'autres espèces d'*Anaplasma* et avec *Ehrlichia*. Il est donc possible que les aptamères sélectionnés reconnaissent également ces espèces/genres. Une reconnaissance inter-espèces et/ou inter-genres n'exclurait pas leur potentielle utilisation en diagnostic puisque la méthode de capture pourrait être couplée avec une détection par PCR, recherchant un gène spécifique d'une espèce. Cette méthode pourra donc éventuellement contribuer à augmenter la sensibilité du diagnostic de différentes rickettsioses.

Les aptamères sélectionnés par ces deux approches pourraient également avoir un potentiel thérapeutique. Un premier essai antibactérien visant à tester la capacité des aptamères Apta-F4, Apta-F8 et Apta-10 à réduire le niveau d'infection des cellules HL-60 par *A. phagocytophilum* a été réalisé. Les résultats de ce premier essai semblent prometteurs pour l'utilisation potentielle d'Apta-F10 en thérapeutique. Les aptamères contre Asp14 peuvent être également intéressants pour une application thérapeutique. Cette protéine joue un rôle majeur dans l'invasion des cellules hôtes par *A. phagocytophilum*. Des études précédentes ont démontré que son inactivation par des peptides recombinants et/ou sérum polyclonaux réduisait considérablement l'infection par *A. phagocytophilum* dans les cellules HL-60 (Kahlon et al., 2013; Seidman et al., 2015; Green et al., 2020; Naimi et al., 2020). Enfin, l'affinité élevée des aptamères Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10 pour les cellules HL-60 NY18 et leur internalisation constituent un vrai atout en thérapeutique. De nombreux exemples ont montré que les aptamères couplés à des molécules anti-cancéreuses étaient capables de délivrer spécifiquement ces molécules dans les cellules cancéreuses souhaitées (Porciani et al., 2018; Wei et al., 2022). Ces caractéristiques observées pour Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10 semblent particulièrement prometteuses pour la délivrance ciblée d'antibiotiques dans les cellules hôtes infectées, avec une importante réduction de dose à la clé.

L'ensemble de ces applications représentent des objectifs à long-terme et nécessiteront de nombreux ajustements et optimisations avant de pouvoir être utilisées dans un contexte réel avec des échantillons biologiques. En effet, les aptamères sélectionnés *in vitro* peuvent ne pas fonctionner *in vivo*. Cette différence peut être due à un changement de la conformation de la cible *in vivo* et également à la demi-vie et biodisponibilité des aptamères (Kalra et al., 2018). Des études de stabilité des aptamères dans les échantillons biologiques seront donc nécessaires. Des modifications chimiques pourront être envisagées pour augmenter leur résistance aux nucléases (Chan et al., 2022). Dans le sang, de nombreuses protéines constituant des cibles potentielles pour les aptamères sont abondamment présentes (albumine par exemple). Les aptamères utilisés pour ces applications doivent donc nécessairement présenter une affinité (K_d très faible) et une spécificité élevées. Pour accroître

l'affinité des aptamères, il est envisageable de tester des séquences tronquées (Hasegawa et al., 2016). Un aptamère à ADN a été isolé contre le facteur de croissance VEGF-165 et les régions tige-boucle ont été partiellement tronquées. L'un des aptamères tronqués a montré une augmentation significative de l'affinité pour la cible (Hasegawa et al., 2008). Une autre stratégie utilisée pour augmenter l'affinité des aptamères est de réaliser des mélanges d'aptamères (« cocktail » d'aptamères) (Kim et al., 2014). Cao *et al.* ont montré pour la première fois la supériorité d'un mélange constitué de cinq aptamères de haute affinité, comparé aux aptamères seuls, pour détecter *Staphylococcus aureus* (Cao et al., 2009). Il pourrait donc être intéressant de tester plusieurs combinaisons d'aptamères parmi les plus affins, afin de potentialiser leurs effets, en diagnostic et/ou thérapeutique.

Tableau 7 Comparaison et résultats des deux approches pour sélectionner des aptamères contre *A. phagocytophilum*

	SELEX contre une suspension enrichie en <i>A. phagocytophilum</i>	SELEX automatisé contre la protéine Asp14 recombinante
Cibles	<i>A. phagocytophilum</i> ou des molécules exprimées au cours de l'infection	Protéine Asp14 recombinante
Étapes réalisées	<ul style="list-style-type: none"> • Optimisation de la méthode de purification d'<i>A. phagocytophilum</i> • Optimisation des conditions PCR et de génération d'ADN simple brin • SELEX • Evolution de la sélection par qPCR et NGS durant le SELEX • Etude de l'affinité et du K_d par cytométrie en flux, contre les cellules infectées ou cellules saines • Etude du site de liaison au microscope confocal sur cellules infectées ou saines • Etude de la spécificité par microscopie confocale • Essais d'identification de la cible • Essais antibactériens • Essais de méthode capture 	<ul style="list-style-type: none"> • Synthèse de la protéine recombinante • Etude de sa conformation • SELEX robotisé • Evolution de la sélection par NGS (post-SELEX) • Etude de l'affinité et du K_d par cytométrie en flux, contre la protéine Asp14 recombinante • Etude du site de liaison sur cellules infectées ou saines en microscopie confocale
Durée de sélection	6 mois d'optimisation et 4 mois de sélection - Rapide + Optimisée	2 mois d'optimisation et de sélection + Rapide – Optimisée
Résultat NGS	Diversité structurale ++	Diversité structurale -
Résultat affinité	K_d de l'ordre du nanomolaire pour les cellules HL-60 NY18 Pas d'affinité pour les cellules saines HL-60	K_d de l'ordre du nanomolaire pour la protéine recombinante Asp14 Pas d'affinité pour les billes magnétiques utilisées comme support
Résultat spécificité	Tests sur d'autres modèles d'infection Mise en évidence d'un aptamère capable de reconnaître sa cible dans un modèle d'infection de cellules invertébrées	Test sur une suspension enrichie d' <i>A. phagocytophilum</i> 6 aptamères reconnaissent leurs cibles situées à la surface des formes DC d' <i>A. phagocytophilum</i>
Applications futures	Recherche fondamentale et/ou à des fins génomiques Diagnostic par une méthode de capture Thérapeutique : molécule thérapeutique ou système de délivrance de médicaments	Recherche à des fins génomiques Diagnostic par une méthode de capture Thérapeutique : molécule thérapeutique
Limites	Cibles inconnues et difficilement identifiables	Risque d'absence de reconnaissance de la protéine exprimée à la surface d' <i>A. phagocytophilum</i>
Intérêt pour la communauté scientifique	Modèle de production d'aptamères vis-à-vis des bactéries intracellulaires strictes → Article prochainement soumis dans Scientific reports	Potentiel de la plateforme robotisée Mise en évidence de l'impact potentielle de l'héparine sur la sélection d'aptamères → Article prochainement soumis dans le journal PLOS ONE

Conclusion

Ma thèse avait pour objectif de sélectionner des aptamères contre *A. phagocytophilum* pour tenter de surmonter les difficultés méthodologiques que rencontre la communauté scientifique et qui limitent les explorations en recherche vis-à-vis de cette bactérie. C'était la première fois que de tels outils étaient développés au sein du groupe VAMP, il a été nécessaire d'implémenter la technologie, les méthodes et les protocoles de sélection des aptamères au sein du laboratoire avant de pouvoir réellement passer aux expérimentations ciblées contre *A. phagocytophilum*. De par son caractère intracellulaire strict, *A. phagocytophilum* est considérée comme une cible particulièrement difficile pour les aptamères, ce qui constituait un défi supplémentaire. Pour augmenter nos chances de réussite, j'ai réalisé ce projet en suivant deux approches.

La première approche avait pour objectif de sélectionner des aptamères contre *A. phagocytophilum* ou des molécules exprimées au cours de l'infection. Pour relever ce défi, un protocole de sélection personnalisé a été développé au laboratoire contre une suspension enrichie en bactéries à partir de cellules infectées HL-60 NY18. Ce protocole de sélection était particulièrement complexe, et a nécessité de nombreuses optimisations. Cette approche a été un succès puisqu'elle a permis d'obtenir trois aptamères (Apta-F4, Apta-F8 et Apta-F10) capables de reconnaître les cellules HL-60 NY18 avec une affinité élevée. En outre, ces aptamères semblent reconnaître des cibles protéiques exprimées à différent temps d'infection et un aptamère reconnaît une protéine commune aux modèles d'infection vertébré et invertébré. L'identification de leurs cibles fera partie des priorités dans les mois à venir pour le groupe. Ces aptamères ont également fait l'objet d'études préliminaires pour démontrer leur potentiel en diagnostic et/ou thérapeutique. Bien que ces études n'aient constitué qu'une première approche exploratoire, nous avons pu mettre en évidence la capacité d'Apta-F10 à réduire le niveau d'infection par *A. phagocytophilum* dans les cellules HL-60.

La seconde approche visait à sélectionner des aptamères contre une protéine située à la surface des formes infectieuses d'*A. phagocytophilum*, Asp14. Pour cela, la sélection a été réalisée contre la protéine Asp14 recombinante et via une plateforme robotisée. Cette approche plus simple et rapide a permis de sélectionner huit aptamères présentant une affinité élevée contre la protéine Asp14 recombinante. Cette étude a également montré pour la première fois l'impact négatif de l'héparine sur la sélection d'aptamères. Enfin, sur les huit séquences sélectionnées, six reconnaissent leur cible à la surface des formes infectieuses d'*A. phagocytophilum*. Des études supplémentaires sont nécessaires pour démontrer la

spécificité des aptamères contre la protéine Asp14 exprimée par *A. phagocytophilum*. Cette approche a permis d'identifier les avantages et les inconvénients d'une approche robotisée et constitue une première étape pour obtenir des aptamères spécifiques des formes infectieuses d'*A. phagocytophilum*.

Au bilan, mes travaux ont permis de confronter deux approches de sélection différentes vis à vis de la même bactérie et d'identifier leurs principaux avantages et leurs limites. Les données comparatives recueillies peuvent être utiles aux chercheurs pour identifier la méthode de sélection la plus appropriée pour leur étude. La sélection réalisée contre la suspension bactérienne enrichie est une première dans le domaine des aptamères, et ce protocole pourra aider la communauté scientifique à sélectionner des aptamères contre d'autres agents pathogènes ou cibles intracellulaires. Enfin, les aptamères sélectionnés offrent de nouvelles perspectives pour apporter une meilleure compréhension des interactions entre *A. phagocytophilum* et ses différents hôtes et pour améliorer le diagnostic et/ou le traitement de l'anaplasmose granulocytaire.

Références

- Adachi, T., and Nakamura, Y. (2019). Aptamers: A Review of Their Chemical Properties and Modifications for Therapeutic Application. *Molecules* 24, 4229. doi: 10.3390/molecules24234229.
- Afrasiabi, S., Pourhajbagher, M., Raoofian, R., Tabarzad, M., and Bahador, A. (2020). Therapeutic applications of nucleic acid aptamers in microbial infections. *J. Biomed. Sci.* 27, 6. doi: 10.1186/s12929-019-0611-0.
- Aguero-Rosenfeld, M. E., Horowitz, H. W., Wormser, G. P., McKenna, D. F., Nowakowski, J., Muñoz, J., et al. (1996). Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. *Ann. Intern. Med.* 125, 904–908. doi: 10.7326/0003-4819-125-11-199612010-00006.
- Akkoyunlu, M., Malawista, S. E., Anguita, J., and Fikrig, E. (2001). Exploitation of Interleukin-8-Induced Neutrophil Chemotaxis by the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Infect. Immun.* 69, 5577–5588. doi: 10.1128/IAI.69.9.5577-5588.2001.
- Alamudi, S. H., Kimoto, M., and Hirao, I. (n.d.). Uptake mechanisms of cell-internalizing nucleic acid aptamers for applications as pharmacological agents. *RSC Med. Chem.* 12, 1640–1649. doi: 10.1039/d1md00199j.
- Alberdi, M. P., Walker, A. R., and Urquhart, K. A. (2000). Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. *Epidemiol. Infect.* 124, 315–323. doi: 10.1017/S0950268899003684.
- Alberdi, P., Ayllon, N., Cruz, A. C., Bell-Sakyi, L., Zwegarth, E., Stuen, S., et al. (2015). Infection of *Ixodes* spp. tick cells with different *Anaplasma phagocytophilum* isolates induces the inhibition of apoptotic cell death. *Ticks Tick-Borne Dis.* 6, 758. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.07.001.
- Alberdi, P., Cabezas-Cruz, A., Prados, P. E., Rayo, M. V., Artigas-Jerónimo, S., and de la Fuente, J. (2019). The redox metabolic pathways function to limit *Anaplasma phagocytophilum* infection and multiplication while preserving fitness in tick vector cells. *Sci. Rep.* 9, 13236. doi: 10.1038/s41598-019-49766-x.
- Alberdi, P., Espinosa, P. J., Cabezas-Cruz, A., and De la Fuente, J. (2016a). *Anaplasma phagocytophilum* Manipulates Host Cell Apoptosis by Different Mechanisms to Establish Infection. *Vet. Sci.* 3, 15. doi: 10.3390/vetsci3030015.
- Alberdi, P., Mansfield, K. L., Manzano-Román, R., Cook, C., Ayllón, N., Villar, M., et al. (2016b). Tissue-Specific Signatures in the Transcriptional Response to *Anaplasma phagocytophilum* Infection of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* Tick Cell Lines. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 20. doi: 10.3389/fcimb.2016.00020.
- Andreotti, R. (2006). Performance of two Bm86 antigen vaccinn formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Braz. J. Vet. Parasitol. Orgao Of. Col. Bras. Parasitol. Vet.* 15, 97–100.

- Artigas-Jerónimo, S., González-García, A., de la Fuente, J., Blanda, V., Shekarkar Azgomi, M., Villar, M., et al. (2022). Low NETosis Induced in *Anaplasma phagocytophilum*-Infected Cells. *Vaccines* 10, 1756. doi: 10.3390/vaccines10101756.
- Asanovich, K. M., Bakken, J. S., Madigan, J. E., Agüero-Rosenfeld, M., Wormser, G. P., and Dumler, J. S. (1997). Antigenic diversity of granulocytic Ehrlichia isolates from humans in Wisconsin and New York and a horse in California. *J. Infect. Dis.* 176, 1029–1034. doi: 10.1086/516529.
- Atif, F. A. (2015). *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol. Res.* 114, 3941–3957. doi: 10.1007/s00436-015-4698-2.
- Avci-Adali, M., Paul, A., Wilhelm, N., Ziemer, G., and Wendel, H. P. (2009). Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation. *Mol. Basel Switz.* 15, 1–11. doi: 10.3390/molecules15010001.
- Azagi, T., Hoeve-Bakker, B. J. A., Jonker, M., Roelfsema, J. H., Sprong, H., and Kerkhof, K. (2022). Technical Evaluation of qPCR Multiplex Assays for the Detection of *Ixodes ricinus*-Borne Pathogens. *Microorganisms* 10, 2222. doi: 10.3390/microorganisms10112222.
- Bakhtiari, H., Palizban, A. A., Khanahmad, H., and Mofid, M. R. (2021). Novel Approach to Overcome Defects of Cell-SELEX in Developing Aptamers against Aspartate β -Hydroxylase. *ACS Omega* 6, 11005–11014. doi: 10.1021/acsomega.1c00876.
- Bakken, J. S., and Dumler, J. S. (2015). Human granulocytic anaplasmosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 29, 341–355. doi: 10.1016/j.idc.2015.02.007.
- Bakken, J. S., Dumler, J. S., Chen, S. M., Eckman, M. R., Van Etta, L. L., and Walker, D. H. (1994). Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA* 272, 212–218.
- Bakken, J. S., Krueth, J., Wilson-Nordskog, C., Tilden, R. L., Asanovich, K., and Dumler, J. S. (1996). Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA* 275, 199–205.
- Bala, J., Chinnapaiyan, S., Dutta, R. K., and Unwalla, H. (2018). Aptamers in HIV research diagnosis and therapy. *RNA Biol.* 15, 327–337. doi: 10.1080/15476286.2017.1414131.
- Barbet, A. F., Meeus, P. F. M., Bélanger, M., Bowie, M. V., Yi, J., Lundgren, A. M., et al. (2003). Expression of multiple outer membrane protein sequence variants from a single genomic locus of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect. Immun.* 71, 1706–1718. doi: 10.1128/IAI.71.4.1706-1718.2003.
- Bard, J., Hall, J., and Levitt, D. (1987). Chlamydia trachomatis (L2 serovar) can be bound, ingested and destroyed by differentiated but not by undifferentiated human promyelocyte cell line HL-60. *J. Gen. Microbiol.* 133, 899–910. doi: 10.1099/00221287-133-4-899.
- Bell-Sakyi, L., Zwegarth, E., Blouin, E. F., Gould, E. A., and Jongejan, F. (2007). Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol.* 23, 450–457. doi: 10.1016/j.pt.2007.07.009.

- Beyer, A. R., Truchan, H. K., May, L. J., Walker, N. J., Borjesson, D. L., and Carlyon, J. A. (2015). The *Anaplasma phagocytophilum* effector AmpA hijacks host cell SUMOylation. *Cell. Microbiol.* 17, 504–519. doi: 10.1111/cmi.12380.
- Birnie, G. D. (1988). The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br. J. Cancer. Suppl.* 9, 41–45.
- Bonilla, M. C., Fingerhut, L., Alfonso-Castro, A., Mergani, A., Schwennen, C., von Köckritz-Blickwede, M., et al. (2020). How Long Does a Neutrophil Live?—The Effect of 24 h Whole Blood Storage on Neutrophil Functions in Pigs. *Biomedicines* 8, 278. doi: 10.3390/biomedicines8080278.
- Bonnet, S., Huber, K., Joncour, G., René-Martellet, M., Stachurski, F., and Zenner, L. (2017a). “2. Biologie des tiques,” in *Tiques et maladies à tiques: Biologie, écologie évolutive, épidémiologie* Didactiques., eds. N. Boulanger and K. D. McCoy (Marseille: IRD Éditions), 53–84. doi: 10.4000/books.irdeditions.9020.
- Bonnet, S. I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A. M., and Duron, O. (2017b). The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 236. doi: 10.3389/fcimb.2017.00236.
- Boulanger, N., Boyer, P., Talagrand-Reboul, E., and Hansmann, Y. (2019). Ticks and tick-borne diseases. *Médecine Mal. Infect.* 49, 87–97. doi: 10.1016/j.medmal.2019.01.007.
- Bouvier-Müller, A., and Ducongé, F. (2018). Application of aptamers for *in vivo* molecular imaging and theranostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 134, 94–106. doi: 10.1016/j.addr.2018.08.004.
- Bown, K. J., Begon, M., Bennett, M., Woldehiwet, Z., and Ogden, N. H. (2003). Seasonal Dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a Rodent-Tick (*Ixodes trianguliceps*) System, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 63–70. doi: 10.3201/eid0901.020169.
- Breuers, S., Bryant, L. L., Legen, T., and Mayer, G. (2019). Robotic assisted generation of 2'-deoxy-2'-fluoro-modified RNA aptamers – High performance enabling strategies in aptamer selection. *Methods* 161, 3–9. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.05.022.
- Breuers, S., and Mayer, G. (2023). Automated ssDNA SELEX Using Histidine-Tagged Target Proteins. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2570, 3–11. doi: 10.1007/978-1-0716-2695-5_1.
- Brosseau, N. E., Vallée, I., Mayer-Scholl, A., Ndao, M., and Karadjian, G. (2023). Aptamer-Based Technologies for Parasite Detection. *Sensors* 23, 562. doi: 10.3390/s23020562.
- Brouqui, P., Bacellar, F., Baranton, G., Birtles, R. J., Bjoërsdorff, A., Blanco, J. R., et al. (2004). Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 1108–1132. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01019.x.
- Brouqui, P., Dumler, J. S., Lienhard, R., Brossard, M., and Raoult, D. (1995). Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Lancet Lond. Engl.* 346, 782–783. doi: 10.1016/s0140-6736(95)91544-3.
- Bruno, J. G. (1997). In Vitro Selection of DNA to Chloroaromatics Using Magnetic Microbead-Based Affinity Separation and Fluorescence Detection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 117–120. doi: 10.1006/bbrc.1997.6517.

- Bruno, J.G., Chao, C.-C., Zhang, Z., Ching, W.-M., Phillips, T., Edge, A., et al. (2016). Preliminary Development of an Enzyme-Linked Fluorescent DNA Aptamer-Magnetic Bead Sandwich Assay for Sensitive Detection of Rickettsia Cells. *Aptamers Synth. Antibodies*.
- Burgert, H.-G., Ruzsics, Z., Obermeier, S., Hilgendorf, A., Windheim, M., and Elsing, A. (2002). "Subversion of Host Defense Mechanisms by Adenoviruses," in *Viral Proteins Counteracting Host Defenses Current Topics in Microbiology and Immunology.*, eds. U. H. Koszinowski and H. Hengel (Berlin, Heidelberg: Springer), 273–318. doi: 10.1007/978-3-642-59421-2_16.
- Cabezas-Cruz, A., Alberdi, P., Valdés, J. J., Villar, M., and de la Fuente, J. (2017). *Anaplasma phagocytophilum* Infection Subverts Carbohydrate Metabolic Pathways in the Tick Vector, *Ixodes scapularis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00023> [Accessed April 1, 2023].
- Cao, X., Li, S., Chen, L., Ding, H., Xu, H., Huang, Y., et al. (2009). Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 37, 4621–4628. doi: 10.1093/nar/gkp489.
- Carlyon, J. A., Latif, D. A., Pypaert, M., Lacy, P., and Fikrig, E. (2004). *Anaplasma phagocytophilum* Utilizes Multiple Host Evasion Mechanisms To Thwart NADPH Oxidase-Mediated Killing during Neutrophil Infection. *Infect. Immun.* 72, 4772–4783. doi: 10.1128/IAI.72.8.4772-4783.2004.
- Catuogno, S., and Esposito, C. L. (2017). Aptamer Cell-Based Selection: Overview and Advances. *Biomedicines* 5, 49. doi: 10.3390/biomedicines5030049.
- CDC (2022). Anaplasmosis home | CDC. *Cent. Dis. Control Prev.* Available at: <https://www.cdc.gov/anaplasmosis/index.html> [Accessed March 26, 2023].
- Chan, K. Y., Kinghorn, A. B., Hollenstein, M., and Tanner, J. A. (2022). Chemical Modifications for a Next Generation of Nucleic Acid Aptamers. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 23, e202200006. doi: 10.1002/cbic.202200006.
- Chandola, C., Kalme, S., Casteleijn, M. G., Urtili, A., and Neerathilingam, M. (2016). Application of aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging. *J. Biosci.* 41, 535–561. doi: 10.1007/s12038-016-9632-y.
- Chang, C.-C. (2021). Recent Advancements in Aptamer-Based Surface Plasmon Resonance Biosensing Strategies. *Biosensors* 11, 233. doi: 10.3390/bios11070233.
- Charlton, J., Sennello, J., and Smith, D. (1997). *In vivo* imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem. Biol.* 4, 809–816. doi: 10.1016/s1074-5521(97)90114-9.
- Chastagner, A. P., Dugat, T., Vourc'h, G., Chabanne, L., Maillard, R., Boulouis, H.-J., et al. (2015). Diversité génétique d'*Anaplasma Phagocytophilum*, agent de l'anaplasmoose granulocytaire, conséquences épidémiologiques et implications pour le contrôle en France. *Bull. Académie Vét. Fr.* 168, 25–37. doi: 10.4267/2042/56542.
- Chen, M., Yu, Y., Jiang, F., Zhou, J., Li, Y., Liang, C., et al. (2016). Development of Cell-SELEX Technology and Its Application in Cancer Diagnosis and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 2079. doi: 10.3390/ijms17122079.

- Chen, S. M., Dumler, J. S., Bakken, J. S., and Walker, D. H. (1994). Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* 32, 589–595. doi: 10.1128/jcm.32.3.589-595.1994.
- Chen, W., Zhang, Y., Lai, Q., Li, Y., and Liu, Z. (2022). Multiple amplification-based fluorometric aptasensor for highly sensitive detection of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106, 6733–6743. doi: 10.1007/s00253-022-12057-z.
- Chen, Z., Liu, H., Jain, A., Zhang, L., Liu, C., and Cheng, K. (2017). Discovery of Aptamer Ligands for Hepatic Stellate Cells Using SELEX. *Theranostics* 7, 2982–2995. doi: 10.7150/thno.19374.
- Cheng, A., Calabro, V., and Frankel, A. (2001). Design of RNA-binding proteins and ligands. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 478–84. doi: 10.1016/S0959-440X(00)00236-0.
- Civit, L., Frago, A., and O'Sullivan, C. K. (2012). Evaluation of techniques for generation of single-stranded DNA for quantitative detection. *Anal. Biochem.* 431, 132–138. doi: 10.1016/j.ab.2012.09.003.
- Contreras, M., Alberdi, P., Mateos-Hernández, L., Fernández de Mera, I. G., García-Pérez, A. L., Vancová, M., et al. (2017). *Anaplasma phagocytophilum* MSP4 and HSP70 Proteins Are Involved in Interactions with Host Cells during Pathogen Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00307> [Accessed April 4, 2023].
- Courtney, J. W., Kostelnik, L. M., Zeidner, N. S., and Massung, R. F. (2004). Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3164–3168. doi: 10.1128/JCM.42.7.3164-3168.2004.
- Cullen, B. R., and Greene, W. C. (1989). Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* 58, 423–426. doi: 10.1016/0092-8674(89)90420-0.
- Davydova, A., Vorobjeva, M., Pysnyi, D., Altman, S., Vlassov, V., and Venyaminova, A. (2015). Aptamers against pathogenic microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 847–865. doi: 10.3109/1040841X.2015.1070115.
- De la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., and Kocan, K. M. (2016). *Anaplasma phagocytophilum* Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts. *Trends Microbiol.* 24, 173–180. doi: 10.1016/j.tim.2015.12.001.
- de Vos, S., Zeinstra, L., Taoufik, O., Willadsen, P., and Jongejan, F. (2001). Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp. Appl. Acarol.* 25, 245–261. doi: 10.1023/a:1010609007009.
- Dhar, S., Gu, F. X., Langer, R., Farokhzad, O. C., and Lippard, S. J. (2008). Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 17356–17361. doi: 10.1073/pnas.0809154105.
- Diafa, S., and Hollenstein, M. (2015). Generation of Aptamers with an Expanded Chemical Repertoire. *Mol. Basel Switz.* 20, 16643–16671. doi: 10.3390/molecules200916643.
- Dong, L., Tan, Q., Ye, W., Liu, D., Chen, H., Hu, H., et al. (2015). Screening and Identifying a Novel ssDNA Aptamer against Alpha-fetoprotein Using CE-SELEX. *Sci. Rep.* 5, 15552. doi: 10.1038/srep15552.

- Drabik, A., Ner-Kluza, J., Mielczarek, P., Civit, L., Mayer, G., and Silberring, J. (2018). Advances in the Study of Aptamer–Protein Target Identification Using the Chromatographic Approach. *J. Proteome Res.* 17, 2174–2181. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00122.
- Drees, A., Trinh, T. L., and Fischer, M. (2023). The Influence of Protein Charge and Molecular Weight on the Affinity of Aptamers. *Pharmaceuticals* 16, 457. doi: 10.3390/ph16030457.
- Dreher, U. M., de la Fuente, J., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M. L., Pusterla, N., Kocan, K. M., et al. (2005). Serologic Cross-Reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 1177–1183. doi: 10.1128/CDLI.12.10.1177-1183.2005.
- Dugat, T., Lagrée, A.-C., Maillard, R., Boulouis, H.-J., and Haddad, N. (2015). Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 61. doi: 10.3389/fcimb.2015.00061.
- Dugat, T., Leblond, A., Keck, N., Lagrée, A.-C., Desjardins, I., Joulié, A., et al. (2017). One particular *Anaplasma phagocytophilum* ecotype infects cattle in the Camargue, France. *Parasit. Vectors* 10, 371. doi: 10.1186/s13071-017-2305-3.
- Dugat, T., Rossignol, M.-N., Rué, O., Loux, V., Marthey, S., Moroldo, M., et al. (2016a). Draft *Anaplasma phagocytophilum* Genome Sequences from Five Cows, Two Horses, and One Roe Deer Collected in Europe. *Genome Announc.* 4, e00950-16. doi: 10.1128/genomeA.00950-16.
- Dugat, T., Zanella, G., Véran, L., Lesage, C., Girault, G., Durand, B., et al. (2016b). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis potentially reveals the existence of two groups of *Anaplasma phagocytophilum* circulating in cattle in France with different wild reservoirs. *Parasit. Vectors* 9, 596. doi: 10.1186/s13071-016-1888-4.
- Dumic, I., Jevtic, D., Veselinovic, M., Nordstrom, C. W., Jovanovic, M., Mogulla, V., et al. (2022). Human Granulocytic Anaplasmosis—A Systematic Review of Published Cases. *Microorganisms* 10, 1433. doi: 10.3390/microorganisms10071433.
- Dumler, J. S. (2012). The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Fems Immunol. Med. Microbiol.* 64, 13–20. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00909.x.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., et al. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and “HGE agent” as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–2165. doi: 10.1099/00207713-51-6-2145.
- Dunn, M. R., Jimenez, R. M., and Chaput, J. C. (2017). Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat. Rev. Chem.* 1, 1–16. doi: 10.1038/s41570-017-0076.
- Dunning Hotopp, J. C., Lin, M., Madupu, R., Crabtree, J., Angiuoli, S. V., Eisen, J. A., et al. (2006). Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet.* 2, e21. doi: 10.1371/journal.pgen.0020021.

- Dyachenko, V., Geiger, C., Pantchev, N., Majzoub, M., Bell-Sakyi, L., Krupka, I., et al. (2013). Isolation of canine *Anaplasma phagocytophilum* strains from clinical blood samples using the Ixodes ricinus cell line IRE/CTVM20. *Vet. Microbiol.* 162, 980–986. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.10.021.
- Eisen, L. (2021). Control of ixodid ticks and prevention of tick-borne diseases in the United States: The prospect of a new Lyme disease vaccine and the continuing problem with tick exposure on residential properties. *Ticks Tick-Borne Dis.* 12, 101649. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101649.
- El Hamiani Khatat, S., Daminet, S., Duchateau, L., Elhachimi, L., Kachani, M., and Sahibi, H. (2021). Epidemiological and Clinicopathological Features of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Dogs: A Systematic Review. *Front. Vet. Sci.* 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.686644> [Accessed July 18, 2023].
- Eleftheriou, A., Cole, D., Kieffer, J., and Pesapane, R. (2022). Molecular prevalence of *Anaplasma marginale* and associated risk factors in beef cattle herds from Ohio: a cross-sectional study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 260, 1839–1843. doi: 10.2460/javma.22.05.0204.
- Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818–822. doi: 10.1038/346818a0.
- Famulok, M., and Mayer, G. (2014). Aptamers and SELEX in Chemistry & Biology. *Chem. Biol.* 21, 1055–1058. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.08.003.
- Foggie, A. (1951). Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* 63, 1–15. doi: 10.1002/path.1700630103.
- Foggie, A. (1962). Studies on tick pyaemia and tick-borne fever. Available at: <https://research-scotland.ac.uk/handle/20.500.12594/24919> [Accessed July 18, 2023].
- Foley, J., and Nieto, N. (2007). Anaplasma phagocytophilum subverts tick salivary gland proteins. *Trends Parasitol.* 23, 3–5. doi: 10.1016/j.pt.2006.10.003.
- Förster, U., Weigand, J., Trojanowski, P., Suess, B., and Wachtveitl, J. (2011). Conformational dynamics of the tetracycline-binding aptamer. *Nucleic Acids Res.* 40, 1807–17. doi: 10.1093/nar/gkr835.
- Frenzel, A., Schirrmann, T., and Hust, M. (2016). Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. *mAbs* 8, 1177–1194. doi: 10.1080/19420862.2016.1212149.
- Galindo, R. C., Ayllón, N., Smrdel, K. S., Boadella, M., Beltrán-Beck, B., Mazariegos, M., et al. (2012). Gene expression profile suggests that pigs (*Sus scrofa*) are susceptible to *Anaplasma phagocytophilum* but control infection. *Parasit. Vectors* 5, 181. doi: 10.1186/1756-3305-5-181.
- Ge, Y., and Rikihisa, Y. (2007). Identification of Novel Surface Proteins of *Anaplasma phagocytophilum* by Affinity Purification and Proteomics. *J. Bacteriol.* 189, 7819–7828. doi: 10.1128/JB.00866-07.
- Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A., and Famulok, M. (1996). RNA Aptamers That Bind L-Arginine with Sub-Micromolar Dissociation Constants and High Enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.* 24, 1029–1036. doi: 10.1093/nar/24.6.1029.

- Gold, L., Ayers, D., Bertino, J., Bock, C., Bock, A., Brody, E. N., et al. (2010). Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker Discovery. *PLoS ONE* 5, e15004. doi: 10.1371/journal.pone.0015004.
- Gold, L., Janjic, N., Jarvis, T., Schneider, D., Walker, J. J., Wilcox, S. K., et al. (2012). Aptamers and the RNA World, Past and Present. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a003582. doi: 10.1101/cshperspect.a003582.
- Goodman, J. L., Nelson, C., Vitale, B., Madigan, J. E., Dumler, J. S., Kurtti, T. J., et al. (1996). Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N. Engl. J. Med.* 334, 209–215. doi: 10.1056/NEJM199601253340401.
- Gordon, W. S., Brownlee, A., Wilson, D. R., and Macleod, J. (1932). Tick-Borne Fever: A Hitherto Undescribed Disease of Sheep. *J. Comp. Pathol. Ther.* 45, 301–307. doi: 10.1016/S0368-1742(32)80025-1.
- Goto, S., Tsukakoshi, K., and Ikebukuro, K. (2017). Development of aptamers against unpurified proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 114, 2706–2716. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.26389>.
- Gragoudas, E. S., Adamis, A. P., Cunningham, E. T., Feinsod, M., and Guyer, D. R. (2004). Pegaptanib for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 351, 2805–2816. doi: 10.1056/NEJMoa042760.
- Green, R. S., Naimi, W. A., Oliver, L. D., O'Bier, N., Cho, J., Conrad, D. H., et al. (2020). Binding of Host Cell Surface Protein Disulfide Isomerase by *Anaplasma phagocytophilum* Asp14 Enables Pathogen Infection. *mBio* 11, e03141-19. doi: 10.1128/mBio.03141-19.
- Gribble, D. H. (1969). Equine ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 155, 462–469.
- Hamedani, N. S., and Müller, J. (2016). Capillary Electrophoresis for the Selection of DNA Aptamers Recognizing Activated Protein C. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1380, 61–75. doi: 10.1007/978-1-4939-3197-2_5.
- Hammers, C. M., and Stanley, J. R. (2014). Antibody Phage Display: Technique and Applications. *J. Invest. Dermatol.* 134, 1–5. doi: 10.1038/jid.2013.521.
- Hasegawa, H., Savory, N., Abe, K., and Ikebukuro, K. (2016). Methods for Improving Aptamer Binding Affinity. *Molecules* 21, 421. doi: 10.3390/molecules21040421.
- Hasegawa, H., Sode, K., and Ikebukuro, K. (2008). Selection of DNA aptamers against VEGF165 using a protein competitor and the aptamer blotting method. *Biotechnol. Lett.* 30, 829–834. doi: 10.1007/s10529-007-9629-6.
- Havlíková, S., Ličková, M., Ayllón, N., Roller, L., Kazimírová, M., Slovák, M., et al. (2013). Immunization with recombinant subolesin does not reduce tick infection with tick-borne encephalitis virus nor protect mice against disease. *Vaccine* 31, 1582–1589. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.01.017.
- Herron, M. J., Ericson, M. E., Kurtti, T. J., and Munderloh, U. G. (2005). The Interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, Endothelial Cells, and Human Neutrophils. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063, 374–382. doi: 10.1196/annals.1355.090.

- Hicke, B. J., Marion, C., Chang, Y. F., Gould, T., Lynott, C. K., Parma, D., et al. (2001). Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein. *J. Biol. Chem.* 276, 48644–48654. doi: 10.1074/jbc.M104651200.
- Hoar, B. R., Nieto, N. C., Rhodes, D. M., and Foley, J. E. (2008). Evaluation of sequential coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 69, 1171–1178. doi: 10.2460/ajvr.69.9.1171.
- Hong, P., Li, W., and Li, J. (2012). Applications of Aptasensors in Clinical Diagnostics. *Sensors* 12, 1181–1193. doi: 10.3390/s120201181.
- Horowitz, H. W., Kilchevsky, E., Haber, S., Aguero-Rosenfeld, M., Kranwinkel, R., James, E. K., et al. (1998). Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N. Engl. J. Med.* 339, 375–378. doi: 10.1056/NEJM199808063390604.
- Hou, Z., Meyer, S., Propson, N. E., Nie, J., Jiang, P., Stewart, R., et al. (2015). Characterization and target identification of a DNA aptamer that labels pluripotent stem cells. *Cell Res.* 25, 390–393. doi: 10.1038/cr.2015.7.
- Huang, B., Troese, M. J., Ye, S., Sims, J. T., Galloway, N. L., Borjesson, D. L., et al. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* APH_1387 Is Expressed throughout Bacterial Intracellular Development and Localizes to the Pathogen-Occupied Vacuolar Membrane. *Infect. Immun.* 78, 1864–1873. doi: 10.1128/IAI.01418-09.
- Huang, W., Xiong, Q., Lin, M., and Rikihisa, Y. (2021). *Anaplasma phagocytophilum* Hijacks Flotillin and NPC1 Complex To Acquire Intracellular Cholesterol for Proliferation, Which Can Be Inhibited with Ezetimibe. *mBio* 12, 10.1128/mbio.02299-21. doi: 10.1128/mbio.02299-21.
- Huhn, C., Winter, C., Wolfspurger, T., Wüppenhorst, N., Strašek Smrdel, K., Skuballa, J., et al. (2014). Analysis of the Population Structure of *Anaplasma phagocytophilum* Using Multilocus Sequence Typing. *PLoS ONE* 9, e93725. doi: 10.1371/journal.pone.0093725.
- Inokuma, H., Brouqui, P., Drancourt, M., and Raoult, D. (2001a). Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of Ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3031–3039. doi: 10.1128/JCM.39.9.3031-3039.2001.
- Inokuma, H., Brouqui, P., Dumler, J. S., and Raoult, D. (2003). Serotyping isolates of *Anaplasma phagocytophilum* by using monoclonal antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 969–972. doi: 10.1128/cdli.10.5.969-972.2003.
- Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Raoult, D., and Brouqui, P. (2001b). Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 241–244. doi: 10.1128/CDLI.8.2.241-244.2001.
- Jaarsma, R. I., Sprong, H., Takumi, K., Kazimirova, M., Silaghi, C., Mysterud, A., et al. (2019). *Anaplasma phagocytophilum* evolves in geographical and biotic niches of vertebrates and ticks. *Parasit. Vectors* 12, 328. doi: 10.1186/s13071-019-3583-8.
- Jalali, T., Salehi-Vaziri, M., Pouriayevali, M. H., and Gargari, S. L. M. (2021). Aptamer based diagnosis of crimean-congo hemorrhagic fever from clinical specimens. *Sci. Rep.* 11, 12639. doi: 10.1038/s41598-021-91826-8.

- Javaherian, S., Musheev, M., Kanoatov, M., Berezovski, M., and Krylov, S. (2009). Selection of aptamers for a protein target in cell lysate and their application to protein purification. *Nucleic Acids Res.* 37, e62. doi: 10.1093/nar/gkp176.
- Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A., and Polisky, B. (1994). High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 263, 1425–1429. doi: 10.1126/science.7510417.
- Jing, M., and Bowser, M. T. (2011). A Review of Methods for Measuring Aptamer-Protein Equilibria. *Anal. Chim. Acta* 686, 9–18. doi: 10.1016/j.aca.2010.10.032.
- Jore, S., Viljugrein, H., Hofshagen, M., Brun-Hansen, H., Kristoffersen, A. B., Nygård, K., et al. (2011). Multi-source analysis reveals latitudinal and altitudinal shifts in range of *Ixodes ricinus* at its northern distribution limit. *Parasit. Vectors* 4, 84. doi: 10.1186/1756-3305-4-84.
- Joshi, R., Janagama, H., Dwivedi, H. P., Senthil Kumar, T. M. A., Jaykus, L.-A., Schefers, J., et al. (2009). Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars. *Mol. Cell. Probes* 23, 20–28. doi: 10.1016/j.mcp.2008.10.006.
- Jung, H., Kim, J.-Y., Kim, K.-B., Chae, Y.-C., Hahn, Y., Kim, J.-W., et al. (2018). Deacetylase activity-independent transcriptional activation by HDAC2 during TPA-induced HL-60 cell differentiation. *PLoS ONE* 13, e0202935. doi: 10.1371/journal.pone.0202935.
- Kahlon, A., Ojogun, N., Ragland, S. A., Seidman, D., Troese, M. J., Ottens, A. K., et al. (2013). *Anaplasma phagocytophilum* Asp14 is an invasin that interacts with mammalian host cells via its C terminus to facilitate infection. *Infect. Immun.* 81, 65–79. doi: 10.1128/IAI.00932-12.
- Kalra, P., Dhiman, A., Cho, W. C., Bruno, J. G., and Sharma, T. K. (2018). Simple Methods and Rational Design for Enhancing Aptamer Sensitivity and Specificity. *Front. Mol. Biosci.* 5. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2018.00041> [Accessed July 28, 2023].
- Keefe, A. D., Pai, S., and Ellington, A. (2010). Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 537–550. doi: 10.1038/nrd3141.
- Kelly, L., Maier, K. E., Yan, A., and Levy, M. (2021). A comparative analysis of cell surface targeting aptamers. *Nat. Commun.* 12, 6275. doi: 10.1038/s41467-021-26463-w.
- Kilili, G. K., Tilton, L., and Karbiwnyk, C. M. (2016). [Letter to the Editor] NaOH concentration and streptavidin bead type are key factors for optimal DNA aptamer strand separation and isolation. *BioTechniques* 61, 114–116. doi: 10.2144/000114449.
- Kim, Y. S., Chung, J., Song, M. Y., Jung, J., and Kim, B. C. (2014). Aptamer cocktails: Enhancement of sensing signals compared to single use of aptamers for detection of bacteria. *Biosens. Bioelectron.* 54, 195–198. doi: 10.1016/j.bios.2013.11.003.
- Kohlberger, M., and Gadermaier, G. (2022). SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 69, 1771–1792. doi: 10.1002/bab.2244.
- Kolm, C., Cervenka, I., Aschl, U. J., Baumann, N., Jakwerth, S., Krska, R., et al. (2020). DNA aptamers against bacterial cells can be efficiently selected by a SELEX process using state-of-the art qPCR and ultra-deep sequencing. *Sci. Rep.* 10, 20917. doi: 10.1038/s41598-020-77221-9.

- Komarova, N., Barkova, D., and Kuznetsov, A. (2020). Implementation of High-Throughput Sequencing (HTS) in Aptamer Selection Technology. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8774. doi: 10.3390/ijms21228774.
- Kovacevic, K. D., Gilbert, J. C., and Jilma, B. (2018). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of aptamers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 134, 36–50. doi: 10.1016/j.addr.2018.10.008.
- Ku, T.-H., Zhang, T., Luo, H., Yen, T. M., Chen, P.-W., Han, Y., et al. (2015). Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing. *Sensors* 15, 16281–16313. doi: 10.3390/s150716281.
- Kubik, M. F., Bell, C., Fitzwater, T., Watson, S. R., and Tasset, D. M. (1997). Isolation and characterization of 2'-fluoro-, 2'-amino-, and 2'-fluoro-/amino-modified RNA ligands to human IFN-gamma that inhibit receptor binding. *J. Immunol.* 159, 259–267. doi: 10.4049/jimmunol.159.1.259.
- Kumar Kulabhusan, P., Hussain, B., and Yüce, M. (2020). Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents. *Pharmaceutics* 12, 646. doi: 10.3390/pharmaceutics12070646.
- Kuo, T., Lai, W., Li, C., Wun, Y., Chang, H., Chen, J., et al. (2014). AS1411 aptamer-conjugated Gd₂O₃:Eu nanoparticles for target-specific computed tomography/magnetic resonance/fluorescence molecular imaging. *Nano Res.* 7, 658–669. doi: 10.1007/s12274-014-0420-4.
- Lai, T.-H., Kumagai, Y., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Rikihisa, Y. (2009). The *Anaplasma phagocytophilum* PleC Histidine Kinase and PleD Diguanylate Cyclase Two-Component System and Role of Cyclic Di-GMP in Host Cell Infection. *J. Bacteriol.* 191, 693–700. doi: 10.1128/JB.01218-08.
- Lamont, E. A., Wang, P., Enomoto, S., Borewicz, K., Abdallah, A., Isaacson, R. E., et al. (2014). A Combined Enrichment and Aptamer Pulldown Assay for *Francisella tularensis* Detection in Food and Environmental Matrices. *PLoS ONE* 9, e114622. doi: 10.1371/journal.pone.0114622.
- Le Dortz, L. L., Rouxel, C., Leroy, Q., Brosseau, N., Boulouis, H.-J., Haddad, N., et al. (2022). Optimized Lambda Exonuclease Digestion or Purification Using Streptavidin-Coated Beads: Which One Is Best for Successful DNA Aptamer Selection? *Methods Protoc.* 5, 89. doi: 10.3390/mps5060089.
- Lee, H. C., and Goodman, J. L. (2006). *Anaplasma phagocytophilum* causes global induction of antiapoptosis in human neutrophils. *Genomics* 88, 496–503. doi: 10.1016/j.ygeno.2006.06.002.
- Lee, S.-C., Gedi, V., Ha, N.-R., Cho, J.-H., Park, H.-C., and Yoon, M.-Y. (2015). Development of receptor-based inhibitory RNA aptamers for anthrax toxin neutralization. *Int. J. Biol. Macromol.* 77, 293–302. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.03.043.
- Levay, A., Brenneman, R., Hoinka, J., Sant, D., Cardone, M., Trinchieri, G., et al. (2015). Identifying high-affinity aptamer ligands with defined cross-reactivity using high-throughput guided systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Nucleic Acids Res.* 43, e82. doi: 10.1093/nar/gkv534.

- Li, R., Ma, Z., Zheng, W., Wang, Z., Yi, J., Xiao, Y., et al. (2022). Multiomics analyses reveals *Anaplasma phagocytophilum* Ats-1 induces anti-apoptosis and energy metabolism by upregulating the respiratory chain-mPTP axis in eukaryotic mitochondria. *BMC Microbiol.* 22, 271. doi: 10.1186/s12866-022-02668-x.
- Li, Z., Fu, X., Huang, J., Zeng, P., Huang, Y., Chen, X., et al. (2021). Advances in Screening and Development of Therapeutic Aptamers Against Cancer Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.662791> [Accessed July 22, 2023].
- Liang, C., Li, D., Zhang, G., Li, H., Shao, N., Liang, Z., et al. (2015). Comparison of the methods for generating single-stranded DNA in SELEX. *The Analyst* 140, 3439–3444. doi: 10.1039/c5an00244c.
- Lin, M., den Dulk-Ras, A., Hooykaas, P. J. J., and Rikihisa, Y. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. *Cell. Microbiol.* 9, 2644–2657. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00985.x.
- Lin, M., and Rikihisa, Y. (2003). Obligatory intracellular parasitism by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* involves caveolae and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Cell. Microbiol.* 5, 809–820. doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00322.x.
- Lipi, F., Chen, S., Chakravarthy, M., Rakesh, S., and Veedu, R. N. (2016). *In vitro* evolution of chemically-modified nucleic acid aptamers: Pros and cons, and comprehensive selection strategies. *RNA Biol.* 13, 1232–1245. doi: 10.1080/15476286.2016.1236173.
- Liu, L., Narasimhan, S., Dai, J., Zhang, L., Cheng, G., and Fikrig, E. (2011). *Ixodes scapularis* salivary gland protein P11 facilitates migration of *Anaplasma phagocytophilum* from the tick gut to salivary glands. *EMBO Rep.* 12, 1196–1203. doi: 10.1038/embor.2011.177.
- Long, Y., Qin, Z., Duan, M., Li, S., Wu, X., Lin, W., et al. (2016). Screening and identification of DNA aptamers toward *Schistosoma japonicum* eggs via SELEX. *Sci. Rep.* 6, 24986. doi: 10.1038/srep24986.
- Lönne, M., Bolten, S., Lavrentieva, A., Stahl, F., Scheper, T., and Walter, J.-G. (2015). Development of an aptamer-based affinity purification method for vascular endothelial growth factor. *Biotechnol. Rep.* 8, 16–23. doi: 10.1016/j.btre.2015.08.006.
- Lou, X., Qian, J., Xiao, Y., Viel, L., Gerdon, A. E., Lagally, E. T., et al. (2009). Micromagnetic selection of aptamers in microfluidic channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2989–2994. doi: 10.1073/pnas.0813135106.
- Lozupone, C., Changayil, S., Majerfeld, I., and Yarus, M. (2003). Selection of the simplest RNA that binds isoleucine. *RNA* 9, 1315–1322. doi: 10.1261/rna.5114503.
- Lu, P., Zhou, Y., Yu, Y., Cao, J., Zhang, H., Gong, H., et al. (2016). RNA interference and the vaccine effect of a subolesin homolog from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Exp. Appl. Acarol.* 68, 113–126. doi: 10.1007/s10493-015-9987-z.
- Luo, P., Liu, Y., Xia, Y., Xu, H., and Xie, G. (2014). Aptamer biosensor for sensitive detection of toxin A of *Clostridium difficile* using gold nanoparticles synthesized by *Bacillus stearothermophilus*. *Biosens. Bioelectron.* 54, 217–221. doi: 10.1016/j.bios.2013.11.013.

- Luo, Z., He, L., Wang, J., Fang, X., and Zhang, L. (2017). Developing a combined strategy for monitoring the progress of aptamer selection. *The Analyst* 142, 3136–3139. doi: 10.1039/c7an01131h.
- Lyu, C., Khan, I. M., and Wang, Z. (2021). Capture-SELEX for aptamer selection: A short review. *Talanta* 229, 122274. doi: 10.1016/j.talanta.2021.122274.
- Ma, Z., Li, R., Hu, R., Zheng, W., Yu, S., Cheng, K., et al. (2021). *Anaplasma phagocytophilum* AptA enhances the UPS, autophagy, and anti-apoptosis of host cells by PSMG3. *Int. J. Biol. Macromol.* 184, 497–508. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.039.
- Madison-Antenucci, S., Kramer, L. D., Gebhardt, L. L., and Kauffman, E. (2020). Emerging Tick-Borne Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 33, e00083-18. doi: 10.1128/CMR.00083-18.
- Mallikaratchy, P. (2017). Evolution of Complex Target SELEX to Identify Aptamers against Mammalian Cell-Surface Antigens. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* 22, 215. doi: 10.3390/molecules22020215.
- Marimuthu, C., Tang, T.-H., Tominaga, J., Tan, S.-C., and Gopinath, S. C. B. (2012). Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. *The Analyst* 137, 1307–1315. doi: 10.1039/c2an15905h.
- Martín, M. E., García-Hernández, M., García-Recio, E. M., Gómez-Chacón, G. F., Sánchez-López, M., and González, V. M. (2013). DNA Aptamers Selectively Target Leishmania infantum H2A Protein. *PLoS ONE* 8, e78886. doi: 10.1371/journal.pone.0078886.
- Massung, R. F., Courtney, J. W., Hiratzka, S. L., Pitzer, V. E., Smith, G., and Dryden, R. L. (2005). *Anaplasma phagocytophilum* in White-tailed Deer. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1604–1606. doi: 10.3201/eid1110.041329.
- Massung, R. F., Lee, K., Mauer, M., and Gusa, A. (2002). Characterization of the rRNA Genes of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila*. *DNA Cell Biol.* 21, 587–596. doi: 10.1089/104454902320308960.
- Massung, R. F., Levin, M. L., Munderloh, U. G., Silverman, D. J., Lynch, M. J., Gaywee, J. K., et al. (2007). Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2138–2143. doi: 10.1128/JCM.00478-07.
- Massung, R. F., Mather, T. N., and Levin, M. L. (2006). Reservoir competency of goats for the Ap-variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect. Immun.* 74, 1373–1375. doi: 10.1128/IAI.74.2.1373-1375.2006.
- Massung, R. F., Priestley, R. A., Miller, N. J., Mather, T. N., and Levin, M. L. (2003). Inability of a Variant Strain of *Anaplasma phagocytophilum* to Infect Mice. *J. Infect. Dis.* 188, 1757–1763. doi: 10.1086/379725.
- Mastrorunzio, J. E., Kurscheid, S., and Fikrig, E. (2012). Postgenomic analyses reveal development of infectious *Anaplasma phagocytophilum* during transmission from ticks to mice. *J. Bacteriol.* 194, 2238–2247. doi: 10.1128/JB.06791-11.
- Matei, I. A., Estrada-Peña, A., Cutler, S. J., Vayssier-Taussat, M., Varela-Castro, L., Potkonjak, A., et al. (2019). A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. *Parasit. Vectors* 12, 599. doi: 10.1186/s13071-019-3852-6.

- Mateos-Hernández, L., Obregón, D., Maye, J., Borneres, J., Versille, N., de la Fuente, J., et al. (2020). Anti-Tick Microbiota Vaccine Impacts *Ixodes ricinus* Performance during Feeding. *Vaccines* 8, 702. doi: 10.3390/vaccines8040702.
- Mateos-Hernández, L., Pipová, N., Allain, E., Henry, C., Rouxel, C., Lagrée, A.-C., et al. (2021). Enlisting the *Ixodes scapularis* Embryonic ISE6 Cell Line to Investigate the Neuronal Basis of Tick-Pathogen Interactions. *Pathog. Basel Switz.* 10, 70. doi: 10.3390/pathogens10010070.
- Mayer, G., Ahmed, M.-S. L., Dolf, A., Endl, E., Knolle, P. A., and Famulok, M. (2010). Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures. *Nat. Protoc.* 5, 1993–2004. doi: 10.1038/nprot.2010.163.
- McConnell, E. M., Nguyen, J., and Li, Y. (2020). Aptamer-Based Biosensors for Environmental Monitoring. *Front. Chem.* 8, 434. doi: 10.3389/fchem.2020.00434.
- Mi, J., Liu, Y., Rabbani, Z. N., Yang, Z., Urban, J. H., Sullenger, B. A., et al. (2010). *In vivo* selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nat. Chem. Biol.* 6, 22–24. doi: 10.1038/nchembio.277.
- Mowla, S. J., Drexler, N. A., Cherry, C. C., Annambholta, P. D., Kracalik, I. T., and Basavaraju, S. V. (n.d.). Ehrlichiosis and Anaplasmosis among Transfusion and Transplant Recipients in the United States - Volume 27, Number 11—November 2021 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. doi: 10.3201/eid2711.211127.
- Muhanguzi, D., Ndekezi, C., Nkamwesiga, J., Kalayou, S., Ochwo, S., Vuyani, M., et al. (2022). “Anti-Tick Vaccines: Current Advances and Future Prospects,” in *Vaccine Design: Methods and Protocols, Volume 2. Vaccines for Veterinary Diseases Methods in Molecular Biology.*, ed. S. Thomas (New York, NY: Springer US), 253–267. doi: 10.1007/978-1-0716-1888-2_15.
- Munderloh, U. G., Jauron, S. D., Fingerle, V., Leitritz, L., Hayes, S. F., Hautman, J. M., et al. (1999). Invasion and Intracellular Development of the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in Tick Cell Culture. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2518–2524. doi: 10.1128/JCM.37.8.2518-2524.1999.
- Munderloh, U. G., Liu, Y., Wang, M., Chen, C., and Kurtti, T. J. (1994). Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Parasitol.* 80, 533–543.
- Munderloh, U. G., Lynch, M. J., Herron, M. J., Palmer, A. T., Kurtti, T. J., Nelson, R. D., et al. (2004). Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet. Microbiol.* 101, 53–64. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.02.011.
- Naimi, W. A., Gumpf, J. J., Green, R. S., Izac, J. R., Zellner, M. P., Conrad, D. H., et al. (2020). Immunization against *Anaplasma phagocytophilum* Adhesin Binding Domains Confers Protection against Infection in the Mouse Model. *Infect. Immun.* 88, e00106-20. doi: 10.1128/IAI.00106-20.
- Neelakanta, G., Sultana, H., Fish, D., Anderson, J. F., and Fikrig, E. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *J. Clin. Invest.* 120, 3179–3190. doi: 10.1172/JCI42868.

- Nguyen Quang, N., Perret, G., and Ducongé, F. (2016). Applications of High-Throughput Sequencing for *In Vitro* Selection and Characterization of Aptamers. *Pharmaceuticals* 9, 76. doi: 10.3390/ph9040076.
- Ni, X., Castanares, M., Mukherjee, A., and Lupold, S. E. (2011). Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons. *Curr. Med. Chem.* 18, 4206–4214.
- Niederlender, S., Fontaine, J.-J., and Karadjian, G. (2021). Potential applications of aptamers in veterinary science. *Vet. Res.* 52, 79. doi: 10.1186/s13567-021-00948-4.
- Nimjee, S. M., and Sullenger, B. A. (2020). Therapeutic Aptamers: Evolving to Find their Clinical Niche. *Curr. Med. Chem.* 27, 4181–4193. doi: 10.2174/0929867326666191001125101.
- Niu, H., Kozjak-Pavlovic, V., Rudel, T., and Rikihisa, Y. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* Ats-1 Is Imported into Host Cell Mitochondria and Interferes with Apoptosis Induction. *PLoS Pathog.* 6, e1000774. doi: 10.1371/journal.ppat.1000774.
- Niu, H., Xiong, Q., Yamamoto, A., Hayashi-Nishino, M., and Rikihisa, Y. (2012). Autophagosomes induced by a bacterial Beclin 1 binding protein facilitate obligatory intracellular infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 20800–20807. doi: 10.1073/pnas.1218674109.
- Niu, H., Yamaguchi, M., and Rikihisa, Y. (2008). Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell. Microbiol.* 10, 593–605. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01068.x.
- Nutiu, R., and Li, Y. (2005). In vitro selection of structure-switching signaling aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 44, 1061–1065. doi: 10.1002/anie.200461848.
- Ojogun, N., Kahlon, A., Ragland, S. A., Troese, M. J., Mastronunzio, J. E., Walker, N. J., et al. (2012). *Anaplasma phagocytophilum* Outer Membrane Protein A Interacts with Sialylated Glycoproteins To Promote Infection of Mammalian Host Cells. *Infect. Immun.* 80, 3748–3760. doi: 10.1128/IAI.00654-12.
- Oki, A. T., Huang, B., Beyer, A. R., May, L. J., Truchan, H. K., Walker, N. J., et al. (2016). *Anaplasma phagocytophilum* APH0032 Is Exposed on the Cytosolic Face of the Pathogen-Occupied Vacuole and Co-opts Host Cell SUMOylation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 108. doi: 10.3389/fcimb.2016.00108.
- Oliver, J. D., Chávez, A. S. O., Felsheim, R. F., Kurtti, T. J., and Munderloh, U. G. (2015). An *Ixodes scapularis* cell line with a predominantly neuron-like phenotype. *Exp. Appl. Acarol.* 66, 427. doi: 10.1007/s10493-015-9908-1.
- Oteng, E. K., Gu, W., and McKeague, M. (2020). High-efficiency enrichment enables identification of aptamers to circulating Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Sci. Rep.* 10, 9706. doi: 10.1038/s41598-020-66537-1.
- Overzier, E., Pfister, K., Herb, I., Mahling, M., Böck, G., and Silaghi, C. (2013). Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), in questing ticks (*Ixodes ricinus*), and in ticks infesting roe deer in southern Germany. *Ticks Tick-Borne Dis.* 4, 320–328. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.01.004.
- Pan, Q., Zhang, X.-L., Wu, H.-Y., He, P.-W., Wang, F., Zhang, M.-S., et al. (2005). Aptamers that preferentially bind type IVB pili and inhibit human monocytic-cell invasion by

- Salmonella enterica* serovar typhi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4052–4060. doi: 10.1128/AAC.49.10.4052-4060.2005.
- Paniel, N., Istamboulié, G., Triki, A., Lozano, C., Barthelmebs, L., and Noguer, T. (2017). Selection of DNA aptamers against penicillin G using Capture-SELEX for the development of an impedimetric sensor. *Talanta* 162, 232–240. doi: 10.1016/j.talanta.2016.09.058.
- Parekh, P., Tang, Z., Turner, P. C., Moyer, R. W., and Tan, W. (2010). Aptamers Recognizing Glycosylated Hemagglutinin Expressed on the Surface of Vaccinia Virus-Infected Cells. *Anal. Chem.* 82, 8642–8649. doi: 10.1021/ac101801j.
- Parizi, L. F., Githaka, N. W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., et al. (2012). The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. *Vet. J.* 194, 158–165. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.05.023.
- Park, J. H., Jee, M. H., Kwon, O. S., Keum, S. J., and Jang, S. K. (2013). Infectivity of hepatitis C virus correlates with the amount of envelope protein E2: development of a new aptamer-based assay system suitable for measuring the infectious titer of HCV. *Virology* 439, 13–22. doi: 10.1016/j.virol.2013.01.014.
- Park, J., Kim, K. J., Grab, D. J., and Dumler, J. S. (2003). *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein-2 (Msp2) forms multimeric complexes in the bacterial membrane. *FEMS Microbiol. Lett.* 227, 243–247. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00687-6.
- Passos, L. M. F. (2012). In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in tick cell lines: a review. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Braz. J. Vet. Parasitol. Orgao Of. Col. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 81–86. doi: 10.1590/s1984-29612012000200002.
- Paul, A., Avci-Adali, M., Ziemer, G., and Wendel, H. P. (2009). Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX. *Oligonucleotides* 19, 243–254. doi: 10.1089/oli.2009.0194.
- Pedra, J. H. F., Narasimhan, S., Rendić, D., DePonte, K., Bell-Sakyi, L., Wilson, I. B. H., et al. (2010). Fucosylation enhances colonization of ticks by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell. Microbiol.* 12, 1222–1234. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01464.x.
- Petrovec, M., Bidovec, A., Sumner, J. W., Nicholson, W. L., Childs, J. E., and Avsic-Zupanc, T. (2002). Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. *Wien. Klin. Wochenschr.* 114, 641–647.
- Petrovec, M., Lotric Furlan, S., Zupanc, T. A., Strle, F., Brouqui, P., Roux, V., et al. (1997). Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1556–1559. doi: 10.1128/jcm.35.6.1556-1559.1997.
- Philip, C. B. (1974). in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co.
- Poitout, F. M., Shinozaki, J. K., Stockwell, P. J., Holland, C. J., and Shukla, S. K. (2005). Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. *J. Clin. Microbiol.* 43, 796–801. doi: 10.1128/JCM.43.2.796-801.2005.
- Poolsup, S., Zaripov, E., Hüttmann, N., Minic, Z., Artyushenko, P. V., Shchugoreva, I. A., et al. (2023). Discovery of DNA aptamers targeting SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and protein-binding epitopes for label-free COVID-19 diagnostics. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 31, 731–743. doi: 10.1016/j.omtn.2023.02.010.

- Porciani, D., Cardwell, L. N., Tawiah, K. D., Alam, K. K., Lange, M. J., Daniels, M. A., et al. (2018). Modular cell-internalizing aptamer nanostructure enables targeted delivery of large functional RNAs in cancer cell lines. *Nat. Commun.* 9, 2283. doi: 10.1038/s41467-018-04691-x.
- Prante, M., Segal, E., Scheper, T., Bahnemann, J., and Walter, J. (2020). Aptasensors for Point-of-Care Detection of Small Molecules. *Biosensors* 10, 108. doi: 10.3390/bios10090108.
- Proctor, M. C., and Leiby, D. A. (2015). Do leukoreduction filters passively reduce the transmission risk of human granulocytic anaplasmosis? *Transfusion (Paris)* 55, 1242–1248. doi: 10.1111/trf.12976.
- Pruneau, L., Moumène, A., Meyer, D. F., Marcelino, I., Lefrançois, T., and Vachiéry, N. (2014). Understanding Anaplasmatataceae pathogenesis using “Omics” approaches. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2014.00086> [Accessed March 26, 2023].
- Pusterla, N., and Madigan, J. E. (2013). Equine Granulocytic Anaplasmosis. *J. Equine Vet. Sci.* 33, 493–496. doi: 10.1016/j.jevs.2013.03.188.
- Quang, N. N., Miodek, A., Cibiel, A., and Ducongé, F. (2017). Selection of Aptamers Against Whole Living Cells: From Cell-SELEX to Identification of Biomarkers. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1575, 253–272. doi: 10.1007/978-1-4939-6857-2_16.
- Quang, N. N., Pestourie, C., Cibiel, A., and Ducongé, F. (2016). How to measure the affinity of aptamers for membrane proteins expressed on the surface of living adherent cells. *Methods* 97, 35–43. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.11.011.
- Radi, A.-E., and Abd-Ellatief, M. R. (2021). Electrochemical Aptasensors: Current Status and Future Perspectives. *Diagnostics* 11, 104. doi: 10.3390/diagnostics11010104.
- Rar, V., Tkachev, S., and Tikunova, N. (2021). Genetic diversity of *Anaplasma* bacteria: Twenty years later. *Infect. Genet. Evol.* 91, 104833. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104833.
- Reller, M. E., and Dumler, J. S. (2018). Development and Clinical Validation of a Multiplex Real-Time Quantitative PCR Assay for Human Infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*. *Trop. Med. Infect. Dis.* 3, 14. doi: 10.3390/tropicalmed3010014.
- Reppert, E., Galindo, R. C., Ayllón, N., Breshears, M. A., Kocan, K. M., Blouin, E. F., et al. (2014). Studies of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep experimentally infected with the human NY-18 isolate: Characterization of tick feeding sites. *Ticks Tick-Borne Dis.* 5, 744–752. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.05.014.
- Rikihisa, Y. (2011). Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 469–489. doi: 10.1128/CMR.00064-10.
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek, Z., Földvári, G., et al. (2014). *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front. Public Health* 2. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2014.00251> [Accessed July 19, 2023].

- Rosina, C., Bottoni, F., and Staurengi, G. (2008). Clinical experience with pegaptanib sodium. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* 2, 485–488.
- Röthlisberger, P., and Hollenstein, M. (2018). Aptamer chemistry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 134, 3–21. doi: 10.1016/j.addr.2018.04.007.
- Roxo, C., Kotkowiak, W., and Pasternak, A. (2019). G-Quadruplex-Forming Aptamers—Characteristics, Applications, and Perspectives. *Molecules* 24, 3781. doi: 10.3390/molecules24203781.
- Ruigrok, V. J. B., Levisson, M., Hekelaar, J., Smidt, H., Dijkstra, B. W., and van der Oost, J. (2012). Characterization of Aptamer-Protein Complexes by X-ray Crystallography and Alternative Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 10537–10552. doi: 10.3390/ijms130810537.
- Saleem, S., Ijaz, M., Farooqi, S., Ghaffar, A., Ali, A., Iqbal, K., et al. (2018). Equine Granulocytic Anaplasmosis 28 years later. *Microb. Pathog.* 119. doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.001.
- Sande, M. G., Çaykara, T., Silva, C. J., and Rodrigues, L. R. (2020). New solutions to capture and enrich bacteria from complex samples. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 209, 335–341. doi: 10.1007/s00430-020-00659-1.
- Santana-Viera, L., Dassie, J. P., Rosàs-Lapeña, M., Garcia-Monclús, S., Chicón-Bosch, M., Pérez-Capó, M., et al. (2023). Combination of protein and cell internalization SELEX identifies a potential RNA therapeutic and delivery platform to treat EphA2-expressing tumors. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 32, 758–772. doi: 10.1016/j.omtn.2023.05.003.
- Sarangji, L. N., Tharani, N., Polapally, S., Rana, S. K., Thodangala, N., Bahekar, V. S., et al. (2021). Infectious bovine abortions: observations from an organized dairy herd. *Braz. J. Microbiol.* 52, 439–448. doi: 10.1007/s42770-020-00414-x.
- Sarkar, M., Reneer, D. V., and Carlyon, J. A. (2007). Sialyl-Lewis x-Independent Infection of Human Myeloid Cells by *Anaplasma phagocytophilum* Strains HZ and HGE1. *Infect. Immun.* 75, 5720–5725. doi: 10.1128/IAI.00905-07.
- Sarkar, M., Troese, M. J., Kearns, S. A., Yang, T., Reneer, D. V., and Carlyon, J. A. (2008). *Anaplasma phagocytophilum* MSP2(P44)-18 predominates and is modified into multiple isoforms in human myeloid cells. *Infect. Immun.* 76, 2090–2098. doi: 10.1128/IAI.01594-07.
- Sasse, J., and Gallagher, S. R. (2009). Staining proteins in gels. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 10, Unit 10.6. doi: 10.1002/0471142727.mb1006s85.
- Scaife, H., Woldehiwet, Z., Hart, C. A., and Edwards, S. W. (2003). *Anaplasma phagocytophilum* Reduces Neutrophil Apoptosis *In Vivo*. *Infect. Immun.* 71, 1995–2001. doi: 10.1128/IAI.71.4.1995-2001.2003.
- Schäfer, I., and Kohn, B. (2020). *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats: A literature review to raise clinical awareness. *J. Feline Med. Surg.* 22, 428–441. doi: 10.1177/1098612X20917600.
- Schaff, U. Y., Trott, K. A., Chase, S., Tam, K., Johns, J. L., Carlyon, J. A., et al. (2010). Neutrophils exposed to *A. phagocytophilum* under shear stress fail to fully activate, polarize, and transmigrate across inflamed endothelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299, C87-96. doi: 10.1152/ajpcell.00165.2009.

- Scharf, W., Schauer, S., Freyburger, F., Petrovec, M., Schaarschmidt-Kiener, D., Liebisch, G., et al. (2011). Distinct Host Species Correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA Gene Clusters ▽. *J. Clin. Microbiol.* 49, 790–796. doi: 10.1128/JCM.02051-10.
- Schmitz, F. R. W., Valério, A., de Oliveira, D., and Hotza, D. (2020). An overview and future prospects on aptamers for food safety. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 6929–6939. doi: 10.1007/s00253-020-10747-0.
- Sefah, K., Yang, Z., Bradley, K. M., Hoshika, S., Jiménez, E., Zhang, L., et al. (2014). *In vitro* selection with artificial expanded genetic information systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 1449–1454. doi: 10.1073/pnas.1311778111.
- Seidman, D., Hebert, K. S., Truchan, H. K., Miller, D. P., Tegels, B. K., Marconi, R. T., et al. (2015). Essential Domains of *Anaplasma phagocytophilum* Invasins Utilized to Infect Mammalian Host Cells. *PLOS Pathog.* 11, e1004669. doi: 10.1371/journal.ppat.1004669.
- Seidman, D., Ojogun, N., Walker, N. J., Mastronunzio, J., Kahlon, A., Hebert, K. S., et al. (2014). *Anaplasma phagocytophilum* surface protein AipA mediates invasion of mammalian host cells. *Cell. Microbiol.* 16, 1133–1145. doi: 10.1111/cmi.12286.
- Semenza, J. C., and Suk, J. E. (2018). Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 365, fnx244. doi: 10.1093/femsle/fnx244.
- Shangguan, D., Bing, T., and Zhang, N. (2015). “Cell-SELEX: Aptamer Selection Against Whole Cells,” in *Aptamers Selected by Cell-SELEX for Theranostics*, eds. W. Tan and X. Fang (Berlin, Heidelberg: Springer), 13–33. doi: 10.1007/978-3-662-46226-3_2.
- Shigdar, S., Macdonald, J., O’Connor, M., Wang, T., Xiang, D., Al. Shamaileh, H., et al. (2013). Aptamers as Theranostic Agents: Modifications, Serum Stability and Functionalisation. *Sensors* 13, 13624–13637. doi: 10.3390/s131013624.
- Shin, H.-S., Gedi, V., Kim, J.-K., and Lee, D. (2019). Detection of Gram-negative bacterial outer membrane vesicles using DNA aptamers. *Sci. Rep.* 9. doi: 10.1038/s41598-019-49755-0.
- Silaghi, C., Kauffmann, M., Passos, L. M. F., Pfister, K., and Zweygarth, E. (2011). Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2, 204–208. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.09.002.
- Silaghi, C., Pfister, K., and Overzier, E. (2014). Molecular Investigation for Bacterial and Protozoan Tick-Borne Pathogens in Wild Boars (*Sus scrofa*) from Southern Germany. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 14, 371–373. doi: 10.1089/vbz.2013.1495.
- Silaghi, C., Skuballa, J., Thiel, C., Pfister, K., Petney, T., Pfäffle, M., et al. (2012). The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) – A suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick-Borne Dis.* 3, 49–54. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.11.005.
- Singh, G., Vajpayee, P., Rani, N., Jyoti, A., Gupta, K. C., and Shanker, R. (2012). Bio-capture of *S. Typhimurium* from surface water by aptamer for culture-free quantification. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 320–326. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.11.039.

- Smith, M. M., Shi, L., and Navre, M. (1995). Rapid identification of highly active and selective substrates for stromelysin and matrilysin using bacteriophage peptide display libraries. *J. Biol. Chem.* 270, 6440–6449. doi: 10.1074/jbc.270.12.6440.
- Sola, M., Menon, A. P., Moreno, B., Meraviglia-Crivelli, D., Soldevilla, M. M., Cartón-García, F., et al. (2020). Aptamers Against Live Targets: Is *In Vivo* SELEX Finally Coming to the Edge? *Mol. Ther. Nucleic Acids* 21, 192–204. doi: 10.1016/j.omtn.2020.05.025.
- Sorgenfrei, M., Hürlimann, L. M., Remy, M. M., Keller, P. M., and Seeger, M. A. (2022). Biomolecules capturing live bacteria from clinical samples. *Trends Biochem. Sci.* 47, 673–688. doi: 10.1016/j.tibs.2022.03.018.
- Stoltenburg, R., Nikolaus, N., and Strehlitz, B. (2012). Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *J. Anal. Methods Chem.* 2012, 415697. doi: 10.1155/2012/415697.
- Stuen, S. (2007). *Anaplasma Phagocytophilum* - the Most Widespread Tick-Borne Infection in Animals in Europe. *Vet. Res. Commun.* 31, 79–84. doi: 10.1007/s11259-007-0071-y.
- Stuen, S., and Bergström, K. (2001). Serological Investigation of Granulocytic Ehrlichia Infection in Sheep in Norway. *Acta Vet. Scand.* 42, 331. doi: 10.1186/1751-0147-42-331.
- Stuen, S., Granquist, E. G., and Silaghi, C. (2013a). *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 31. doi: 10.3389/fcimb.2013.00031.
- Stuen, S., Handeland, K., Frammarsvik, T., and Bergström, K. (2001). Experimental *Ehrlichia phagocytophila* infection in red deer (*Cervus elaphus*). *Vet. Rec.* 149, 390–392. doi: 10.1136/vr.149.13.390.
- Stuen, S., Okstad, W., Bergström, K., and Bårdsen, K. (2009). Superinfection occurs in *Anaplasma phagocytophilum* infected sheep irrespective of infection phase and protection status. *Acta Vet. Scand.* 51, 41. doi: 10.1186/1751-0147-51-41.
- Stuen, S., Pettersen, K. S., Granquist, E. G., Bergström, K., Bown, K. J., and Birtles, R. J. (2013b). *Anaplasma phagocytophilum* variants in sympatric red deer (*Cervus elaphus*) and sheep in southern Norway. *Ticks Tick-Borne Dis.* 4, 197–201. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.11.014.
- Suh, S. H., Dwivedi, H. P., and Jaykus, L.-A. (2014). Development and evaluation of aptamer magnetic capture assay in conjunction with real-time PCR for detection of *Campylobacter jejuni*. *LWT - Food Sci. Technol.* 56, 256–260. doi: 10.1016/j.lwt.2013.12.012.
- Sukumaran, B., Carlyon, J. A., Cai, J.-L., Berliner, N., and Fikrig, E. (2005). Early Transcriptional Response of Human Neutrophils to *Anaplasma phagocytophilum* Infection. *Infect. Immun.* 73, 8089–8099. doi: 10.1128/iai.73.12.8089-8099.2005.
- Sukumaran, B., Mastronunzio, J. E., Narasimhan, S., Fankhauser, S., Uchil, P. D., Levy, R., et al. (2011). *Anaplasma phagocytophilum* AptA modulates Erk1/2 signalling. *Cell. Microbiol.* 13, 47–61. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01516.x.
- Sukumaran, B., Narasimhan, S., Anderson, J. F., DePonte, K., Marcantonio, N., Krishnan, M. N., et al. (2006). An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma*

- phagocytophilum* in tick salivary glands. *J. Exp. Med.* 203, 1507–1517. doi: 10.1084/jem.20060208.
- Sultana, H., Neelakanta, G., Kantor, F. S., Malawista, S. E., Fish, D., Montgomery, R. R., et al. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* induces actin phosphorylation to selectively regulate gene transcription in *Ixodes scapularis* ticks. *J. Exp. Med.* 207, 1727–1743. doi: 10.1084/jem.20100276.
- Sumption, K. J., Wright, D. J., Cutler, S. J., and Dale, B. A. (1995). Human ehrlichiosis in the UK. *Lancet Lond. Engl.* 346, 1487–1488. doi: 10.1016/s0140-6736(95)92502-3.
- Svobodová, M., Pinto, A., Nadal, P., and O' Sullivan, C. K. (2012). Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 835–842. doi: 10.1007/s00216-012-6183-4.
- Tabb, J. S., Rapoport, E., Han, I., Lombardi, J., and Green, O. (2022). An antigen-targeting assay for Lyme disease: Combining aptamers and SERS to detect the OspA protein. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 41, 102528. doi: 10.1016/j.nano.2022.102528.
- Tagliafierro, T., Joshi, S., Sameroff, S., Marques, A., Dumler, J. S., Mishra, N., et al. (2022). Detection of antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* using linear peptides. *Ticks Tick-Borne Dis.* 13, 101999. doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.101999.
- Takahashi, M., Sakota, E., and Nakamura, Y. (2016). The efficient cell-SELEX strategy, lcell-SELEX, using isogenic cell lines for selection and counter-selection to generate RNA aptamers to cell surface proteins. *Biochimie* 131, 77–84. doi: 10.1016/j.biochi.2016.09.018.
- Thiel, W. H., Thiel, K. W., Flenker, K. S., Bair, T., Dupuy, A. J., McNamara, J. O., et al. (2015). Cell-Internalization SELEX: Method for Identifying Cell-Internalizing RNA Aptamers for Delivering siRNAs to Target Cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1218, 187–199. doi: 10.1007/978-1-4939-1538-5_11.
- Thiviyanathan, V., and Gorenstein, D. G. (2012). Aptamers and the Next Generation of Diagnostic Reagents. *Proteomics Clin. Appl.* 6, 563–573. doi: 10.1002/prca.201200042.
- Thomas, R. J., Birtles, R. J., Radford, A. D., and Woldehiwet, Z. (2012). Recurrent bacteraemia in sheep infected persistently with *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Comp. Pathol.* 147, 360–367. doi: 10.1016/j.jcpa.2012.02.005.
- Thomas, V., and Fikrig, E. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* specifically induces tyrosine phosphorylation of ROCK1 during infection. *Cell. Microbiol.* 9, 1730–1737. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00908.x.
- Tolle, F., Wilke, J., Wengel, J., and Mayer, G. (2014). By-Product Formation in Repetitive PCR Amplification of DNA Libraries during SELEX. *PLoS ONE* 9, e114693. doi: 10.1371/journal.pone.0114693.
- Tong, X., Ga, L., Ai, J., and Wang, Y. (2022). Progress in cancer drug delivery based on AS1411 oriented nanomaterials. *J. Nanobiotechnology* 20, 57. doi: 10.1186/s12951-022-01240-z.
- Troese, M. J., and Carlyon, J. A. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* dense-cored organisms mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand 1. *Infect. Immun.* 77, 4018–4027. doi: 10.1128/IAI.00527-09.

- Troese, M. J., Kahlon, A., Ragland, S. A., Ottens, A. K., Ojogun, N., Nelson, K. T., et al. (2011). Proteomic Analysis of *Anaplasma phagocytophilum* during Infection of Human Myeloid Cells Identifies a Protein That Is Pronouncedly Upregulated on the Infectious Dense-Cored Cell. *Infect. Immun.* 79, 4696–4707. doi: 10.1128/IAI.05658-11.
- Truchan, H. K., Seidman, D., and Carlyon, J. A. (2013). Breaking In and Grabbing A Meal: *Anaplasma phagocytophilum* Cellular Invasion, Nutrient Acquisition, and Promising Tools for Their Study. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 15, 1017–1025. doi: 10.1016/j.micinf.2013.10.010.
- Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505–510. doi: 10.1126/science.2200121.
- Tuomi, J. (1967). Experimental studies on bovine tick-borne fever. 1. Clinical and haematological data, some properties of the causative agent, and homologous immunity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 70, 429–445.
- Ulrich, H., Magdesian, M. H., Alves, M. J. M., and Colli, W. (2002). *In Vitro* Selection of RNA Aptamers That Bind to Cell Adhesion Receptors of *Trypanosoma cruzi* and Inhibit Cell Invasion. *J. Biol. Chem.* 277, 20756–20762. doi: 10.1074/jbc.M111859200.
- Underwood, J., Harvey, C., Lohstroh, E., Pierce, B., Chambers, C., Guzman Valencia, S., et al. (2022). *Anaplasma phagocytophilum* Transmission Activates Immune Pathways While Repressing Wound Healing in the Skin. *Life* 12, 1965. doi: 10.3390/life12121965.
- Villar, M., Ayllón, N., Kocan, K. M., Bonzón-Kulichenko, E., Alberdi, P., Blouin, E. F., et al. (2015). Identification and Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* Proteins Involved in Infection of the Tick Vector, *Ixodes scapularis*. *PLOS ONE* 10, e0137237. doi: 10.1371/journal.pone.0137237.
- Vivekananda, J., and Kiel, J. L. (2006). Anti-*Francisella tularensis* DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay. *Lab. Invest.* 86, 610–618. doi: 10.1038/labinvest.3700417.
- Wan, L.-Y., Yuan, W.-F., Ai, W.-B., Ai, Y.-W., Wang, J.-J., Chu, L.-Y., et al. (2019). An exploration of aptamer internalization mechanisms and their applications in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 16, 207–218. doi: 10.1080/17425247.2019.1575808.
- Wang, J., Dyachenko, V., Munderloh, U. G., and Straubinger, R. K. (2015). Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from endothelial cells to peripheral granulocytes in vitro under shear flow conditions. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 204, 593–603. doi: 10.1007/s00430-015-0387-0.
- Wang, T., Chen, C., Larcher, L. M., Barrero, R. A., and Veedu, R. N. (2019a). Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. *Biotechnol. Adv.* 37, 28–50. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.001.
- Wang, T., Yin, W., AlShamaileh, H., Zhang, Y., Tran, P. H.-L., Nguyen, T. N.-G., et al. (2019b). A Detailed Protein-SELEX Protocol Allowing Visual Assessments of Individual Steps for a High Success Rate. *Hum. Gene Ther. Methods* 30, 1–16. doi: 10.1089/hgtb.2018.237.

- Wei, R., Liu, H.-B., Jongejan, F., Jiang, B.-G., Chang, Q.-C., Fu, X., et al. (2017). Cultivation of *Anaplasma ovis* in the HL-60 human promyelocytic leukemia cell line. *Emerg. Microbes Infect.* 6, 1–7. doi: 10.1038/emi.2017.70.
- Wei, Z., Zhou, Y., Wang, R., Wang, J., and Chen, Z. (2022). Aptamers as Smart Ligands for Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy. *Pharmaceutics* 14, 2561. doi: 10.3390/pharmaceutics14122561.
- Wilson, R. (2011). Preparation of single-stranded DNA from PCR products with streptavidin magnetic beads. *Nucleic Acid Ther.* 21, 437–440. doi: 10.1089/nat.2011.0322.
- Woldehiwet, Z., Horrocks, B. K., Scaife, H., Ross, G., Munderloh, U. G., Bown, K., et al. (2002). Cultivation of an Ovine Strain of *Ehrlichia phagocytophila* in Tick Cell Cultures. *J. Comp. Pathol.* 127, 142–149. doi: 10.1053/jcpa.2002.0574.
- Woldehiwet, Z., and Yavari, C. (2014). *Anaplasma phagocytophilum* up-regulates some anti-apoptotic genes in neutrophils and pro-inflammatory genes in mononuclear cells of sheep. *J. Comp. Pathol.* 150, 351–356. doi: 10.1016/j.jcpa.2014.01.005.
- Wu-Chuang, A., Mateos-Hernandez, L., Maitre, A., Rego, R. O. M., Šíma, R., Porcelli, S., et al. (2023). Microbiota perturbation by anti-microbiota vaccine reduces the colonization of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus*. *Microbiome* 11, 151. doi: 10.1186/s40168-023-01599-7.
- Xiong, Q., Lin, M., Huang, W., and Rikihisa, Y. (2019). Infection by *Anaplasma phagocytophilum* Requires Recruitment of Low-Density Lipoprotein Cholesterol by Flotillins. *mBio* 10, e02783-18. doi: 10.1128/mBio.02783-18.
- Xiong, Q., Lin, M., and Rikihisa, Y. (2009). Cholesterol-Dependent *Anaplasma phagocytophilum* Exploits the Low-Density Lipoprotein Uptake Pathway. *PLOS Pathog.* 5, e1000329. doi: 10.1371/journal.ppat.1000329.
- Xu, Y., Jiang, X., Zhou, Y., Ma, M., Wang, M., and Ying, B. (2021). Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment Technologies and Aptamer-Based Applications: Recent Progress and Challenges in Precision Medicine of Infectious Diseases. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.704077> [Accessed July 12, 2023].
- Yaseen, R., Blodkamp, S., Lüthje, P., Reuner, F., Völlger, L., Naim, H., et al. (2017). Antimicrobial activity of HL-60 cells compared to primary blood-derived neutrophils against *Staphylococcus aureus*. *J. Negat. Results Biomed.* 16. doi: 10.1186/s12952-017-0067-2.
- Yeoh, T. S., Anna, A., Tang, T.-H., and Citartan, M. (2022). Development of an optimization pipeline of asymmetric PCR towards the generation of DNA aptamers: a guide for beginners. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 38, 31. doi: 10.1007/s11274-021-03209-w.
- Yoon, S., and Rossi, J. J. (2018). Aptamers: Uptake mechanisms and intracellular applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 134, 22–35. doi: 10.1016/j.addr.2018.07.003.
- Yu, H., Jiang, B., and Chaput, J. C. (2011). Aptamers can Discriminate Alkaline Proteins with High Specificity. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 12, 2659–2666. doi: 10.1002/cbic.201100252.

- Yu, Q., Li, M., Liu, M., Huang, S., Wang, G., Wang, T., et al. (2021). Selection and Characterization of ssDNA Aptamers Targeting Largemouth Bass Virus Infected Cells With Antiviral Activities. *Front. Microbiol.* 12. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.785318> [Accessed June 18, 2023].
- Zeidner, N. S., Burkot, T. R., Massung, R., Nicholson, W. L., Dolan, M. C., Rutherford, J. S., et al. (2000). Transmission of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis by Ixodes spinipalpis Ticks: Evidence of an enzootic cycle of dual infection with *Borrelia burgdorferi* in Northern Colorado. *J. Infect. Dis.* 182, 616–619. doi: 10.1086/315715.
- Zhang, L., Liu, Y., Ni, D., Li, Q., Yu, Y., Yu, X., et al. (2008). Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA* 300, 2263–2270. doi: 10.1001/jama.2008.626.
- Zhang, N., Wang, J., Bing, T., Liu, X., and Shangguan, D. (2022). Transferrin receptor-mediated internalization and intracellular fate of conjugates of a DNA aptamer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 27, 1249–1259. doi: 10.1016/j.omtn.2022.02.006.
- Zhang, Y., Lai, B. S., and Juhas, M. (2019). Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Mol. Basel Switz.* 24, E941. doi: 10.3390/molecules24050941.
- Zhao, J., He, X., Bo, B., Liu, X., Yin, Y., and Li, G. (2012). A “signal-on” electrochemical aptasensor for simultaneous detection of two tumor markers. *Biosens. Bioelectron.* 34, 249–252. doi: 10.1016/j.bios.2012.02.016.
- Zhou, J., and Rossi, J. (2017). Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 181–202. doi: 10.1038/nrd.2016.199.
- Zhu, Q., Liu, G., and Kai, M. (2015). DNA Aptamers in the Diagnosis and Treatment of Human Diseases. *Molecules* 20, 20979–20997. doi: 10.3390/molecules201219739.
- Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., et al. (2017). Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2142. doi: 10.3390/ijms18102142.
- Zou, X., Wu, J., Gu, J., Shen, L., and Mao, L. (2021). DNA aptamer against EV-A71 VP1 protein: selection and application. *Virology* 18, 164. doi: 10.1186/s12985-021-01631-y.

Annexes

Publications scientifiques

Article de recherche publié

Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Brosseau, N.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Lagrée, A.-C.; Deshuillers, P.L. Optimized Lambda Exonuclease Digestion or Purification Using Streptavidin-Coated Beads: Which One Is Best for Successful DNA Aptamer Selection? *Methods Protoc.* 2022, 5, 89. <https://doi.org/10.3390/mps5060089>.

Revue soumise

Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Boulouis, H.-J.; Lagrée, A.-C.; Deshuillers, P.L.; Haddad, N. Tick-borne diseases in Europe : current control tools and the promise of aptamers. Soumis dans le journal *Veterinary Parasitology*.

Articles de recherche prochainement soumis

Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Ducongé, F.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Deshuillers, P.L.; Lagrée, A.-C.. Aptamer selection against cell extracts containing the zoonotic obligate intracellular bacterium, *Anaplasma phagocytophilum*. *Scientific reports*.

Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Breuers, S.; Mayer, G. ; Ducongé, F.; Boulouis, H.-J.; Deshuillers, P.L.; Lagrée, A.-C.; Haddad, N. Selection of DNA aptamers against Asp14, a surface protein of *Anaplasma phagocytophilum*. Prochainement soumis dans le journal *PLOS ONE*.

Communications scientifiques dans des congrès

Communications orales

Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Lagrée, A.-C.; Deshuillers, P.L. Les aptamères, des outils innovants et prometteurs pour l'étude d'*Anaplasma phagocytophilum*. Journée de la recherche de l'EnvA, Septembre 2022.

Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Ducongé, F.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Deshuillers, P.L.; Lagrée, A.-C. New perspectives for the detection of *Anaplasma phagocytophilum* infection using aptamers. International Symposium of the World Association of veterinary Laboratory Diagnosticians (ISWALVD), June 2023.

Posters

Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Brosseau, N.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Lagrée, A.-C.; Deshuillers, P.L. Improvements of the SELEX protocol by comparing the two most used single-stranded DNA generation methods. Aptamer Oxford, April 2022.

Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Lagrée, A.-C.; Deshuillers, P.L. Development and optimization of an aptamer selection protocol against *Anaplasma phagocytophilum*. Tick and tick-borne pathogen conference (TTP 10th), September 2022.

Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Ducongé, F.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Deshuillers, P.L. Aptamers, an innovative tool to study *Anaplasma phagocytophilum*. Tick and tick-borne pathogen conference (TTP 10th), September 2022.

Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Ducongé, F.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Deshuillers, P.L.; Lagrée, A.-C. Aptamers, an innovative tool to study *Anaplasma phagocytophilum*. ANSES scientific and doctoral days. October 2022.

Le Dortz, L.L.; Rouxel, C.; Leroy, Q.; Ducongé, F.; Boulouis, H.-J.; Haddad, N.; Deshuillers, P.L.; Lagrée, A.-C. Selection of aptamers against *Anaplasma phagocytophilum*, a tick-borne and zoonotic bacterium. Aptamer Oxford, May 2023.

Encadrements de stagiaires

Quentin Leroy, étudiant en Master 2 de recherche, stage 6 mois de janvier à juin 2021.

Benjamin Dupuis, étudiant ingénieur à AgroParisTech, stage découverte de juillet à août 2021. Encadrement dans le cadre de l'UE la recherche et moi. Accueil de l'étudiant tous les jeudi après-midi pendant 4 mois.

Marion Chardon, étudiante en BTS 2^{ème} année, stage technicien de laboratoire, de novembre à février 2022/2023.

Arthur Soulabail, étudiant en BTS 2^{ème} année, stage technicien de laboratoire, de janvier à mars 2023.

Financements

J'ai obtenu trois financements pour mon séjour en Allemagne, dans le cadre du label EIR-A (Agreenium) : une bourse à la mobilité internationale (1 000 euros, AgroParisTech ABIES), une bourse Jean Walter Zellidja (4 000 euros, Académie Française) et une bourse donnée par l'association MedVetNet (2 700 euros).

Title : Aptamers, as new tools for the study and detection of *Anaplasma phagocytophilum*, a strict intracellular zoonotic bacterium.

Keywords : *Anaplasma phagocytophilum*, granulocytic anaplasmosis, aptamers, SELEX, HL- 60 NY18, Asp14.

Abstract :

Anaplasma phagocytophilum is a strict intracellular, zoonotic bacterium, transmitted by ticks of the *Ixodes* genus. This bacterium is responsible for granulocytic anaplasmosis in human and cattle and infects other mammals, such as wild ruminants and other susceptible domestic species. Many unanswered scientific questions remain, particularly regarding strain variability, epidemiological cycles and mechanisms of host-pathogen interaction. These gaps of knowledge are due to the difficulty to isolate and cultivate *A. phagocytophilum*, because of the few permissive cells available and the lack of specific tools, in particular monoclonal antibodies. Aptamers are oligonucleotides able to bind with high affinity and specificity to a wide range of targets. These innovative tools are a good alternative to monoclonal antibodies and powerful tools in infectiology (purification, detection or therapeutics tools...). The aim of my thesis was therefore to apply the aptamer technology to the study of *A. phagocytophilum*, using two approaches. The first approach was designed to select aptamers against *A. phagocytophilum* or molecules expressed during infection, using the SELEX (Systematic evolution of ligand by exponential enrichment) method. After selection, three aptamers showed a high affinity for HL-60 cells infected with the human American NY18 strain. They were able to recognize proteins that were expressed at different time points during infection. This approach is a first step in the identification of potential new molecules for diagnostic/therapeutic or research. The second approach was to select aptamers against Asp14, a surface protein of *A. phagocytophilum*. The selection was performed against the recombinant protein using a robotic platform. Eight aptamers specific to the recombinant Asp14 protein were obtained. Six of them recognized their target in a suspension enriched with bacteria. This second approach is a first step to obtain aptamers against infectious forms of *A. phagocytophilum* and to develop a method to capture bacteria from field samples. My work provides a comparison of these two approaches, applied to the same study model, *A. phagocytophilum*. It paves the way for the development of aptamers against other strict intracellular pathogenic bacteria, particularly those transmitted by arthropods, and for research that is part of the long-term One Health approach (reducing the use of antibiotics and/or acaricides).

Titre : Les aptamères, de nouveaux outils pour l'étude et la détection d'*Anaplasma phagocytophilum*, une bactérie zoonotique intracellulaire stricte.

Mots-clés : *Anaplasma phagocytophilum*, anaplasmose granulocytaire, aptamères, SELEX, HL-60 NY18, Asp14.

Résumé :

Anaplasma phagocytophilum est une bactérie zoonotique intracellulaire stricte et transmise par les tiques du genre *Ixodes*. Elle est l'agent de l'anaplasmose granulocytaire humaine et bovine et infecte également d'autres mammifères, comme les rongeurs ou les ruminants sauvages, ainsi que d'autres espèces domestiques sensibles. De nombreuses questions de recherche persistent, concernant la variabilité des souches, les cycles épidémiologiques et les hôtes réservoirs des souches infectant les humains et les animaux domestiques. En outre, les mécanismes impliqués dans les interactions avec les hôtes vertébrés/invertébrés restent largement à explorer. Ces lacunes résultent de la difficulté à isoler et cultiver *A. phagocytophilum*, du fait du manque de cellules permissives au laboratoire et d'outils spécifiques susceptibles de permettre son étude, notamment les anticorps monoclonaux. Les aptamères sont des oligonucléotides d'ADN ou d'ARN simple brin dont la structure tridimensionnelle leur permet d'interagir spécifiquement avec une molécule cible. Ils constituent une bonne alternative aux anticorps monoclonaux et sont de puissants outils en infectiologie (outils de purification, détection, thérapeutique...). L'objectif de ma thèse était donc de transposer la technologie des aptamères à l'étude d'*A. phagocytophilum*. Deux approches ont été développées. La première a consisté à sélectionner des aptamères contre *A. phagocytophilum* ou des molécules exprimées au cours de l'infection, par la méthode d'enrichissement par contact avec la cible, appelée SELEX. Trois aptamères ont présenté une forte affinité vis à vis des cellules HL-60 infectées par la souche humaine américaine NY18. Ils sont capables de reconnaître des protéines exprimées à différents temps de l'infection. Cette approche est une première étape dans l'identification potentielle de nouvelles molécules d'intérêt en diagnostic/thérapeutique et en recherche. La seconde approche visait à sélectionner des aptamères contre la protéine de surface d'*A. phagocytophilum*, Asp14. Le SELEX a été effectué sur la protéine recombinante, via une plateforme robotisée. Huit aptamères spécifiques de la protéine Asp14 recombinante ont été obtenus, dont six reconnaissent leur cible dans une suspension enrichie en bactéries. Cette approche est notamment une première étape pour obtenir des aptamères contre les formes infectieuses d'*A. phagocytophilum* et pour développer une méthode de capture de la bactérie au sein de prélèvements. Mes travaux ont permis de confronter deux approches de sélection différentes, appliquées à un même modèle d'étude, *A. phagocytophilum*. Ils ouvrent la voie au développement d'aptamères contre d'autres bactéries pathogènes intracellulaires strictes, notamment vectorisées par les arthropodes, et à des pistes de recherche qui s'intègrent sur le long terme dans la démarche One Health (contribution à la lutte contre l'antibiorésistance, réduction de l'utilisation d'acaricides).