

Summary

Animal trypanosomosis or nagana is a neglected tropical disease that affects both livestock and agricultural productivity in endemic countries. The causative agents belong to the salivarian section within the *Trypanosoma* genus and encompass both human-infective parasites (*T. brucei rhodesiense* and *T. brucei gambiense*) and animal-restricted ones (*T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*). Salivarian trypanosomes are extracellular blood-borne flagellated protozoa. Though originally transmitted by the tsetse fly (*Glossina* genus) and thus restricted to the vector's habitat in the Sub-Saharan Africa (the so-called 'tsetse belt'), some species have adapted to mechanical transmission by any biting insect, enabling their spread throughout Central and South America. Such is the case of *Trypanosoma vivax*, one of the main responsible agents of the wasting disease.

Despite the number of diagnostic tests available nowadays, few of them are actually applicable in field conditions due to costly equipment or particular sample processing requirements. Vaccination against trypanosomosis remains challenging due to the elegant immune evasion mechanism evolved by the parasites, known as antigenic variation. This strategy allows the parasites to periodically vary their antigenic appearance, thus preventing their immune clearance by host antibodies. Two alternatives are left to tackle the disease: mass-treatment of cattle and tsetse fly control strategies. Whereas the first is leading to ever-increasing cases of drug-resistance, the latter is of little use in the fight against *T. vivax*, due to its ability to be mechanically transmitted. Therefore, development of new easy-to-use highly specific diagnostics is urgently needed, both for controlling the spread of infection within a herd and as an epidemiological tool to assess the risk of re-infection in a certain region. In the research presented here, we have used Nanobodies® as tools for the development of new diagnostics due to the advantages they offer over conventional antibodies, such as unique epitope recognition potential (their nanometer size range enables them to access buried epitopes), the ease to produce them in large quantities in bacterial expression systems and the possibility of selecting high affinity binders by phage display and panning following *in vivo* affinity maturation.

Complementing the applied research focusing on diagnostics for *Trypanosoma vivax* infections, the aim of gaining insight into the poorly characterized immunobiology of the disease is also addressed. In contrast to the extensive research focused on *T. brucei* little is known regarding the immunobiology of *T. vivax*. In the context of *T. brucei* infections, tumor necrosis factor (TNF) has been shown to play a major negative role in disease development. Previous results obtained by our research group using comparative infection models of wild type (WT) and TNF-deficient (TNF^{-/-}) mice have shown that the latter are able to survive equally long to the infection while little infection-related signs (e.g. no anemia) are observed and in spite of attaining higher parasitemias. Here, we show that during *T. vivax* infections the opposite holds true. *T. vivax*-infected TNF^{-/-} mice develop a very severe disease with obvious signs of infection (e.g. anemia, loss of locomotor activity and ruffled fur) and significantly shorter mean survival. Interestingly, TNF is critical for proper parasitemia control and thus these mice do not survive longer than the first parasitemia peak. This questions the generally accepted view that antibodies are the main mediators of parasitemia control and reflects the complexity of humoral, cellular and biochemical factors that eventually result in trypanotolerance.

Samenvatting

Dierlijke trypanosomiase of nagana is een verwaarloosde tropische ziekte die vee en landbouw productiviteit beïnvloedt in endemische landen. De verwekkers ervan behoren tot het *Trypanosoma* geslacht. Sommige van deze parasieten infecteren mensen (bv. *T. brucei rhodesiense*, *T. brucei gambiense* and *T. cruzi*) terwijl andere parasieten dieren infecteren (bv. *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*). Met uitzondering van *T. cruzi* zijn trypanosomen extracellulaire bloedoverdraagbare protozoa. Ze werden oorspronkelijk overgedragen door de tsetse vlieg (*Glossina* geslacht) en waren dus beperkt tot het leefgebied van de vector in het sub-Sahara Afrika (de zogenaamde 'tsetse riem'). Desondanks hebben sommige soorten zich aangepast aan mechanische overdracht door een bijtend insect, wat hun verspreiding tot zuid-Amerika heft toegelaten. Dit is bijvoorbeeld het geval bij de *Trypanosoma vivax*, een van de voornaamste verantwoordelijke voor deze slopende ziekte.

Ondanks het aantal diagnostische testen beschikbaar vandaag de dag zijn er weinig onder hen die effectief ter plaatse toegepast kunnen worden t.g.v. de dure apparatuur of specifieke vereisten voor de verwerking van de monsters. Inenting tegen trypanosomiase blijft uitdagend door het elegante mechanisme van ontwijking door het immuunsysteem dat is geëvolueerd door de parasieten, gekend als antigenische variatie. Deze strategie laat de parasieten toe om periodiek hun antigen expressie te variëren en voorkomen zo hun eliminatie door de antilichamen van de gast. Er blijven twee alternatieven over om deze ziekte aan te pakken: massabehandeling van vee en strategieën om de tsetse vlieg te controleren. Terwijl de eerste tot meer en meer gevallen van drugresistentie leidt, is de laatste aanpak van weinig nut in het gevecht tegen *T. vivax* doordat het mechanisch overgebracht kan worden. Zodoende is de ontwikkeling van nieuwe eenvoudig te gebruiken diagnostiek met hoge specificiteit van dringend belang, beide om de verspreiding van de infectie binnen een kudde te controleren en als epidemiologisch hulpmiddel om het risico van herinfectie te kunnen inschatten in een bepaalde regio. In het hier voorgestelde onderzoek hebben we 'Nanobodies' gebruikt als hulpmiddelen om nieuwe diagnostiek te ontwikkelen vanwege de voordelen die ze bieden ten opzichte

van conventionele antilichamen, zoals hun uniek potentieel om een epitoom te herkennen (hun nanometer grootteschaal laat hen toe om begraven epitopen te bereiken), het gemak om hen in grote hoeveelheden te produceren in bacteriële expressiesystemen en de mogelijkheid om hoge affiniteit binders te selecteren door faagdisplay en panning volgend op *in vivo* affiniteitsmaturatie.

Aanvullend op het toegepaste onderzoek toegespitst op diagnostiek voor *Trypanosoma vivax* infecties, hadden we ons als doel gesteld om inzicht te verwerven in de slecht gekarakteriseerde immunobiologie van de ziekte. In tegenstelling tot het uitgebreide onderzoek naar *T. brucei*, is er weinig geweten omtrent *T. vivax*. In de context van *T. brucei* infecties is het aangetoond dat de tumor necrose factor (TNF) een voorname negatieve rol speelt in de ontwikkeling van de ziekte. Vorige resultaten binnen onze onderzoeksgroep, gebruik makend van vergelijkende infectiemodellen van wild type (WT) en TNF gebrekkige (TNF^{-/-}) muizen, hebben aangetoond dat deze laatste muizen de infectie even lang kunnen overleven terwijl weinig infectiegerelateerde signalen (vb. geen bloedarmoede) geobserveerd worden en dit ondanks ze hogere parasitemie bereiken. Hier tonen we aan dat tijdens *T. vivax* infecties het omgekeerde waar is. *T. vivax* geïnfecteerde TNF^{-/-} muizen ontwikkelen een zeer ernstige ziekte met duidelijke tekenen van infectie (bv. Bloedarmoede, verlies van bewegingsactiviteit) en significant kortere gemiddelde levensduur. Een interessante observatie is dat TNF van kritisch belang is voor de controle van parasitemia en deze muizen overleven dus niet langer dan de eerste parasitemia piek. Dit stelt het algemeen aanvaarde beeld in vraag dat antilichamen de voornaamste mediators zijn van parasitemia controle en duidt op de complexiteit van humorale, cellulaire en biochemische factoren die uiteindelijk tot trypanotolerantie leiden.