

Physiopathologie de l'échinococcose alvéolaire : IL-33 et pistes thérapeutiques

Brice Autier

▶ To cite this version:

Brice Autier. Physiopathologie de l'échinococcose alvéolaire : IL-33 et pistes thérapeutiques. Microbiologie et Parasitologie. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B075 . tel-04348100

HAL Id: tel-04348100 https://theses.hal.science/tel-04348100

Submitted on 16 Dec 2023 $\,$

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 DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605 Biologie Santé Spécialité : Microbiologie, Virologie, Parasitologie

Par

Brice AUTIER

Physiopathologie de l'échinococcose alvéolaire : IL-33 et pistes thérapeutiques

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 15 décembre 2022 Unité de recherche : UMR U1085 – Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail

Rapporteurs avant soutenance :

Pierre Flori Sonia Lacroix-Lamandé

Composition du Jury :

Président : Laurence Millon Examinateurs : Céline Beauvillain Pierre Flori Sonia Lacroix-Lamandé

Dir. de thèse : Florence Robert-Gangneux Co-dir. de thèse : Sarah Dion PU-PH, Université Jean Monnet (Saint-Etienne) CR, INRAE/Université de Tours

PU-PH, Univ Bourgogne Franche-Comté MCU-PH, Université d'Angers PU-PH, Université Jean Monnet (Saint-Etienne) CR, INRAE/Université de Tours

PU-PH, Université Rennes 1 MCU, Université Rennes 1

Remerciements

Je remercie mes rapporteurs Dr Sonia Lacroix-Lamandé et Pr Pierre Flori d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer cette thèse, et Dr Céline Beauvillain d'examiner ce travail. J'espère réussir à vous transmettre tout l'intérêt que j'ai porté à l'étude de cette pathologie fascinante qu'est l'échinococcose alvéolaire, et que ce travail nourrira des échanges enrichissants lors de ma soutenance.

Je tiens à remercier Pr Laurence Millon de me faire l'honneur de présider le jury de soutenance. Je suis certain que votre expérience et vos connaissances de l'échinococcose alvéolaire conduiront à des discussions et des réflexions constructives sur mes travaux autour de cette maladie.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi individuel, Dr Françoise Debierre-Grockiego et Dr Cédric Ménard. Nos échanges lors de mes présentations m'ont nettement enrichi et m'ont permis donner bien plus de valeur à ce travail. Merci pour vos conseils avisés.

Je remercie Michel Samson de m'avoir accueilli au sein de l'Irset et au sein de l'équipe 2. Merci de m'avoir permis de réaliser ce beau projet de recherche et merci pour votre soutien durant tout mon doctorat. J'espère avoir fait honneur à l'équipe et à l'Irset à l'occasion de mes diverses communications.

Je remercie infiniment (et même plus) Sarah Dion pour son encadrement, sa bienveillance, sa confiance, son implication et la liste pourrait encore continuer longtemps ! Je suis impressionné par la manière dont tu arrives à être sur tous les fronts à la fois. Merci pour tout, tu m'as vraiment permis de m'améliorer en tout domaine, et tout ça dans la bonne humeur. C'est un vrai plaisir de travailler avec toi et je suis fier et heureux de pouvoir continuer dans cette direction.

Merci à Florence Robert-Gangneux pour son encadrement également. Merci pour vos avis, discussions, conseils et aussi pour toutes ces relectures et corrections que je demande à la limite des *dealines* ! Merci pour ce beau projet de revue de la littérature sur l'échinococcose alvéolaire avec une équipe multinationale de spécialistes, c'est une chance d'avoir pu faire un tel travail.

Bien évidemment un grand merci à toute l'équipe 2 de l'Irset, que ce soit les collègues de Parasitologie, Hélène, Aymeric, et des autres groupes, Jacques Le Seyec, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel, Claire Piquet-Pellorce, Céline Raguenes-Nicol, Laurence Amiot, Jérémy Bomo, Nicolas Vu, Charlotte, Ghania, Ghiles, Mélanie et les autres. En particulier un grand merci à Christelle Manuel, pour ton soutien indéfectible dans les travaux sur échino comme pour la pédagogie ! Merci de supporter de faire, et refaire, et rerefaire le même Western qui ne peut pas marcher, comme de supporter nos changements d'organisation de TPs ! Un grand merci à Jean-Pierre Gangneux. Cela fait 10 ans depuis ma première apparition dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rennes, en tant qu'externe. Merci de vous être battu depuis tout ce temps pour le service et pour l'équipe, et en particulier merci d'avoir défendu le poste que j'occupe actuellement et celui à venir. L'équipe des parasitologues de Rennes est assez hors-ducommun et on vous le doit, pourvu que ça dure.

Merci à tous ceux qui ont travaillé avec nous sur ces projets, Nolwenn Brandhonneur, Alexis Verger, Marylène Chollet-Krugler, l'équipe IPVBTA de Tours, Pr Isabelle DImier-Poisson, Nicolas Aubrey, Anne Di Tommaso, Fanny Boursin, nos amis suisses Britta Lundstroem-Stadelmann, Andrew Hemphill, Joachim Müller, Norbert Müller et toute l'équipe de la Vetsuisse Faculty de Bern, mais également Bruno Gottstein, Philipp Kronenberg et Peter Deplazes. Egalement merci à Kaer Labs pour les projets en cours, et toutes les plates-formes Biosit avec qui nous avons interagit : Arche, H2P2, en particulier Pascale Bellaud pour l'immunofluorescence, MRic, cytomeTRI, ImPACcell. Merci à tous les stagiaires passés par là, Yaquine, Valentin, Cheïma et Marine.

Merci aussi à tous ceux avec qui j'ai travaillé le reste du temps : tout le personnel de la faculté de Pharmacie de Rennes, Sandra Abgrall, les techniciens, aides-de-laboratoire et cadres du service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rennes et du laboratoire d'urgence de l'Hôpital Sud, ainsi que tous leurs biologistes : Sorya, Anne, Brigitte, Maxime, Mylène et Albane. Merci également à l'équipe de chirurgie hépatique et viscérale de penser à moi dès qu'un cas d'échinococcose se présente.

Merci à Laurence Bunetel, de m'avoir fait confiance et qu'on soit allés au bout de notre démarche. Il semblerait que ça ait réussi et je vous le dois également, encore merci.

Bien évidemment un grand merci à tous les proches qui me supportent, me soutiennent et m'accompagnent dans des moments très diversifiés ! Angus, Ronan, Jéjé, toute l'équipe du Bagad Pipe Band Brieg, mon compère Kévin, Jim' et Charly AKA « les voisins » et tous les autres !

Un grand merci à ma famille, même si entre la thèse et le COVID on ne s'est pas vus si souvent !

Evidemment un grand merci à Plaquette, grâce à qui j'ai eu l'autorisation de sortir en pleine période de confinement. Merci à toi d'aboyer tous les matins à 7h30.

Et surtout merci à Erell et bien sûr à Mira, de me supporter moi et mon rythme de travail. Je vous aime, et ma vie, avec vous, sera forcément la meilleure des vies.

Table des matières

Liste des	abréviations	5		
iste des figures6				
Liste des	tableaux	6		
Revue de	e la littérature	7		
I. <i>E</i>	Echinococcus multilocularis, agent de l'échinococcose alvéolaire	8		
Α.	Systématique	8		
В.	Cycle parasitaire	8		
C.	Epidémiologie 1	0		
D.	Présentation clinique1	1		
E.	Démarche diagnostique1	1		
F.	Prise en charge thérapeutique1	3		
11. F	Réponse immune lors d'une échinococcose alvéolaire1	3		
Α.	Modèles expérimentaux animaux1	3		
В.	Lors de l'invasion 1	5		
C.	Phase précoce1	6		
D.	Phase tardive	8		
E.	Sensibilité et résistance à l'infection 2	2		
F.	Immunomodulation par Echinococcus multilocularis 2	5		
III. L	alarmine IL-33 2	7		
Α.	Structure et sources	7		
В.	Le récepteur ST2 2	9		
C.	Principales populations cibles	0		
1	. Les lymphocytes Th2	0		
2	. Les lymphocytes T _{reg}	0		
3	. Les cellules lymphoïdes innées	1		
4	. Les mastocytes	3		
5	. Les monocytes-macrophages	3		

	6. Les polynucléaires	34
C	D. Implications dans des processus pathologiques	34
	1. Cancers	34
	2. Allergies	35
	3. Maladies inflammatoires et auto-immunes	36
	4. Maladies infectieuses	36
IV.	Chimiothérapie de l'échinococcose alvéolaire : état des connaissances	37
۵	A. Méthodes d'évaluation des composés antiparasitaires	37
	1. Approches <i>in vitro</i>	37
	2. Approches <i>in vivo</i>	40
В	B. Antiparasitaires conventionnels	41
C	C. Traitement de sauvetage : amphotéricine B	42
C	D. Autres molécules évaluées	43
E	E. Nouvelles formulations thérapeutiques	46
Axe 1	: rôle de l'IL-33 dans l'échinococcose alvéolaire	50
I.	Contexte et objectifs	51
١١.	Résumé	51
III.	Article	52
Axe 2	: nouvelles pistes thérapeutiques dans l'échinococcose alvéolaire	95
I.	Contexte et objectifs	96
١١.	Résumé	97
111.	Article (en préparation)	97
Persp	ectives et conclusions	125
Référe	ences	131
Annex	xe	163

Liste des abréviations

AAM : Alternatively Activated Macrophages
ABZ : albendazole
ADN : acide désoxyribonucléique
ATP : adénosine triphosphate

CCL : C-C motif chemokine ligand CE50 : concentration efficace à 50% CHU : Centre Hospitalo-Universitaire CNR : Centre National de Référence CPCG : culture primaire de cellules germinatives CXCL : C-X-C motif chemokine ligand

DALY : Disability-Adjusted Life Years
DAMP : Dammage-Associated Molecular Pattern
DC : Cellule Dendritique
DICV : Déficit Immunitaire Commun Variable

EA : échinococcose alvéolaire EGF : Epidermal Growth Factor ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FDA : Food and Drug Administration FGL2 : Fibrinogen-Like protein 2 FoxP3 : Forkhead Box P3

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor GM-CSF : Granulocyte-Macrophages Colony Stimulating Factor

HAI : Hémagglutination indirecte HEC : High Endothelial Cells HEV : High Endothelial Venules HIES : Hyper IgE Syndrome

IFN : interféron Ig : immunoglobuline IL : interleukine ILC : Innate Lymphoid Cell INKT : invariant Natural Killer T cell IRM : imagerie par résonnance magnétique

LPS : lipopolysaccharide LTi : Lymphoid Tissue inducer MAIT : Mucosa Associated Invariant T cells
 MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
 MoDC : cellules dendritiques dérivée de monocytes
 Mφ : Macrophage

NAD : Nicotinamide Adénine DinucléotideNK : Natural KillerNO : monoxyde d'azote

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEG : polyéthylène glycol
PET : Tomographie par Emission de Positrons
PGI : phosphoglucose isomérase
p.i. : post-infection
PLGA : poly(acide lactique co-glycolique)
PNE : polynucléaire neutrophile
PSC : protoscolex
pNPP : paraNitroPhénylPhosphate

RT-qPCR : Reverse Transcription quantitative PCR

scFv : single chain Fragment Variable

TAM : Tumor Associated Macrophage TGF : Transforming Growth Factor Th : T helper TNF : Tumor Necrosis Factor Treg : T regulatory

VEGF : Vascular and Endothelial Growth Factor

WT: Wild-Type

Liste des figures

Figure 1. Cycle d' <i>Echinococcus multilocularis</i> .	8
Figure 2. Morphologie des métacestodes d' <i>Echinococcus multilocularis</i>	9
Figure 3. Distribution d' Echinococcus multilocularis et Echinococcus granulosus dans le monde	. 10
Figure 4. Images typiques d'échinococcose alvéolaire hépatique en IRM	. 12
Figure 5. Coupes histologiques de lésions murines précoces, coloration à l'hématoxyline et éosine.	. 17
Figure 6. Coupes histologiques de lésions humaines tardives, coloration à l'hématoxyline et éosine	e.20
Figure 7. Schéma explicatif du mécanisme d'action hypothétique de FGL2	. 21
Figure 8. Schéma récapitulatif de la réponse immune au cours de l'échinococcose alvéolaire	. 25
Figure 9. Structure de l'IL-33	. 27
Figure 10. Multiples cibles de l'IL-33	. 28
Figure 11. Représentation de sST2 et de la voie de signalisation de l'axe IL-33/ST2L	. 29
Figure 12. Les rôles multiples de l'IL-33 au cours des maladies infectieuses	. 37
Figure 13. Schéma explicatif du test de la phosphoglucose isomérase.	. 39
Figure 14. Représentation schématique des types de nanoparticules.	. 47
Figure 15. Schéma du projet de recherche NANOTHERA-ECHINO	. 96
Figure 16. Schéma explicatif de la technologie de cytométrie de masse.	127

Liste des tableaux

Tableau I. Modèles expérimentaux animaux, avantages et inconvénients	14
Tableau II. Résumé des propriétés immunomodulatrices directement imputables à Ed	chinococcus
multilocularis	26
Tableau III. Caractéristiques des différentes cellules lymphoïdes innées	32
Tableau IV. Comparaison des méthodes d'évaluation in vitro de l'activité anti-E. multiloculo	aris 40
Tableau V. Autres composés évalués contre les formes larvaires d'Echinococcus multiloculo	aris 44
Tableau VI. Résumé des différentes nanoparticules à visée thérapeutique	48

REVUE DE LA LITTERATURE

I. Echinococcus multilocularis, agent de l'échinococcose alvéolaire

A. Systématique

Echinococcus multilocularis est un helminthe parasite appartenant au règne Metazoa, superembranchement Lophotrochozoa, embranchement Platyhelminthes, classe Cestoda, Ordre Cyclophillidea, de la famille Taeniidae [1,2]. Cette famille intègre les genres *Echinococcus*, *Taenia*, *Versteria* et *Hydatigera*. Actuellement, le genre *Echinococcus* est lui-même divisé en 9 espèces dont 5 espèces cryptiques : *Echinococcus granulosus sensu lato* (intégrant *E. granulosus sensu stricto, E. canadensis, E. ortleppi, E. equinus* et *E. felidis*), *E. multilocularis, Echinococcus oligarthra, Echinococcus vogeli* et *Echinococcus shiquicus* [3,4].

B. Cycle parasitaire

La forme adulte d'*E. multilocularis* est un ver plat segmenté de quelques millimètres, dont le strobile est composé de 3-4 proglottis (anneaux). Ce stade parasite l'intestin grêle de ses hôtes définitifs, des mammifères carnivores, principalement le renard roux *Vulpes vulpes* mais également d'autres Canidae (par exemple *Canis lupus, Canis aureus, Nyctereutes procyonoides* [5–7]). Seul le dernier proglottis produit des œufs, alors libérés dans la lumière du tube digestif et éliminés dans l'environnement avec les selles de l'hôte (Figure 1).



Figure 1. Cycle d'*Echinococcus multilocularis*.

Illustrations : ^{1,2,4} <u>https://phil.cdc.gov/</u>, Domaine publique, ¹ #22124, ² #18949, ⁴ #335. ³ Wikimedia Common, <u>attribution CC BY 2.5</u>, <u>lien</u>, extrait de [8].

Les œufs peuvent résister dans le milieu extérieur plusieurs semaines voire mois en cas de climat frais et humide [9]. Ces œufs sont ensuite ingérés par des petits rongeurs sauvages, appartenant notamment aux genres *Arvicola, Microtus* et *Myodes* [10], éclosent dans l'intestin sous l'action des sucs digestifs et libèrent un oncosphère. L'oncosphère est un embryon hexacanthe contenu dans l'œuf dès la ponte, dont les structures internes (crochets, cellules musculaires, nerveuses et sécrétoires) permettent l'effraction active de la muqueuse digestive afin de gagner la circulation sanguine [11]. Après ingestion, il est donc immédiatement infestant pour son hôte. L'oncosphère parvient ensuite au foie par le système porte, où il est généralement stoppé en raison de la fonction de filtre de cet organe. Il se transforme alors en forme larvaire, appelée métacestode, qui consiste en un ensemble hétérogène de microkystes parasitaires entrelacés de tissus conjonctifs de l'hôte (Figure 2A). L'infection par cette forme larvaire est appelée échinococcose alvéolaire (EA). Cette appellation tient de l'aspect macroscopique du tissu atteint, les microkystes formant des « alvéoles » à la coupe (Figure 2B).



Figure 2. Morphologie des métacestodes d'Echinococcus multilocularis.

(A) Foie de gerbille (*Meriones unguiculatus*) atteinte d'EA, extrait de [12]. (B) Section de foie humain infecté par *E. multilocularis*, Service de Parasitologie-Mycologie, CHU Rennes. (C) Coupes histologiques d'un métacestode hépatique d'*E. multilocularis* fertile isolé chez un rat de coton (*Sigmodon hispidus*), extrait de [12]. fv fluide vésiculeux, psc protoscolex, flèche couche striée, pointe de flèche couche germinative. (D) Microscopie électronique à transmission de la paroi du métacestode, Université Rennes 1. cg couche germinative, cs couche striée. L'interface entre les deux couches est composée de microtriches issus de la couche germinative, inclues dans la couche striée polysaccharidique.

Le métacestode est constitué d'une couche externe acellulaire composée quasi-exclusivement de polysaccharides, dite stratifiée, et d'une couche interne riche en cellules parasitaires (cellules musculaires, cellules souches, cellules de réserve de glycogène), dite couche germinale (Figures 2C et 2D) [4,13]. L'intérieur des microkystes est rempli d'un liquide appelé fluide vésiculeux. Les lésions sont dites fertiles chez les hôtes intermédiaires naturels car elles contiennent des protoscolex dans le fluide vésiculeux, formés à partir de la couche germinale. Par prédation, les rongeurs infectés sont ingérés par des hôtes définitifs. Les protoscolex ainsi ingérés se dévaginent dans le tube digestif pour devenir des scolex qui s'attachent à la muqueuse digestive grâce à leurs crochets. Rapidement le strobile se forme, permettant d'atteindre la forme adulte en quelques semaines. L'humain est vis-à-vis d'*E. multilocularis* une impasse parasitaire ainsi qu'un hôte intermédiaire inadapté. En effet, les métacestodes sont rarement fertiles et ne contiennent qu'exceptionnellement des protoscolex chez l'homme.

C. Epidémiologie

L'incidence de l'EA est estimée à environ 18 000 cas par an, dont la vaste majorité (91%) surviennent en Chine (Figure 3) [14]. Cependant, l'infection se développant très lentement, le nombre d'infections en cours est bien plus élevé, le nombre d'années de vie en bonne santé perdues (ou DALY pour *Disability Adjusted Life Years*) étant estimé à 666 000 par an [14]. Le parasite n'est distribué que dans l'hémisphère nord [15]. Cette répartition est imputée à un arrêt de la transmission du parasite en saison sèche : les œufs sont sensibles à la dessication, et les hôtes intermédiaires infectés par *E. multilocularis* ont une vie trop courte pour permettre la reprise du cycle par la suite [16].



Figure 3. Distribution d'*Echinococcus multilocularis* et *Echinococcus granulosus* dans le monde.

Extrait de [17]. L'échinococcose alvéolaire à *E. multilocularis,* contrairement à l'échinococcose kystique à *E. granulosus* qui est bien plus fréquente, est limitée à l'hémisphère Nord.

En Europe, le parasite s'étend depuis la Russie jusqu'à la France pour sa limite occidentale, et le nord de l'Italie pour sa limite méridionale [15]. La distribution du parasite en Europe de l'est reste actuellement mal connue. En France, une trentaine de cas d'EA sont diagnostiqués et déclarés chaque année au Centre National de Référence (CNR) des échinococcoses [18]. Le parasite est surtout présent sur l'est du territoire, du département du Nord jusqu'aux Hautes Alpes, mais il est également retrouvé dans une moindre mesure jusque dans le Cantal, le Loir-et-Cher, la Manche et l'est de l'Ille-et-Vilaine [19].

La contamination humaine à *E. multilocularis* survient par contact direct avec des renards (chasseurs, taxidermistes, vétérinaires) ou de manière indirecte, par ingestion d'œufs du parasite présents sur les mains en contact avec de la terre souillée ou sur des aliments souillés, en particulier les baies sauvages. Si les différentes études épidémiologiques font inconstamment le lien entre la consommation de végétaux sauvages, notamment les fruits des bois, et l'EA, elles permettent cependant de mettre en évidence des facteurs de risque majeurs, tels que posséder un chien ou un chat, être agriculteur, avoir un potager, mâcher de l'herbe et manipuler des renards [20].

D. Présentation clinique

Lors d'une EA, le parasite prend la forme d'une masse hépatique à croissance perpétuelle, pouvant parfois envahir d'autres tissus, par contiguïté ou par dissémination métastatique, comme par exemple les poumons, le cerveau, la rate ou les os [21]. Exceptionnellement, certains patients peuvent présenter une(des) lésion(s) extra-hépatiques isolées [22]. Les manifestations cliniques sont la conséquence du syndrome tumoral dû à la masse parasitaire, par exemple douleurs abdominales, troubles digestifs, cholestase ou encore hépatomégalie lors des atteintes hépatiques [22]. Cette présentation clinique proche d'un cancer, de même que l'aspect scanographique parfois très proche de celui d'un processus néoplasique, peuvent conduire à une errance diagnostique durant parfois des années après la première image suspecte [22]. La croissance du parasite étant lente, l'incubation est classiquement décrite comme longue (10-15 ans), mais la multiplication des examens médicaux au sein de la population a conduit à augmenter la proportion d'infections asymptomatiques diagnostiquées fortuitement [22,23]. En cas de réponse immunitaire efficace, *E. multilocularis* peut aussi former chez son hôte intermédiaire des formes calcifiées, dites « avortées », exemptes de cellules parasitaires vivantes [4].

E. Démarche diagnostique

Le diagnostic de l'EA repose souvent sur une découverte fortuite par imagerie, qu'il s'agisse de l'échographie abdominale, du scanner, ou de l'IRM [21]. Les images observées au cours des cas d'EA sont très variées. Elles prennent généralement la forme d'une masse solide hétérogène, dont les

contours peuvent être diffus ou partiellement bien délimités, et pouvant contenir en son sein des zones de contenu liquidien et/ou des calcifications (Figures 4A et 4B) [24]. Les ensembles de microkystes liquidiens « en grappes », particulièrement évocateurs en IRM avec pondération T2 (faisant apparaître les liquides en hypersignal), sont considérés comme pathognomoniques de l'EA (Figures 4C et 4D) [25]. Les lésions avortées prennent un aspect hyperéchogène/hyperdense, car calcifiées [24]. L'association au PET scanner avec acquisition tardive à 3h après injection est recommandée, en particulier pour la recherche de lésions secondaires au cours du bilan d'extension [21,26].



Figure 4. Images typiques d'échinococcose alvéolaire hépatique en IRM.

Lésions hétérogènes, au contenu en hyposignal T1 (A, B, D) et aux contours parfois légèrement réhaussés (A). L'aspect des lésions est variable, elles peuvent notamment être bien circonscrites (A) ou plus diffuses (B). En (C) et (D), la même image en pondération T2 et T1 respectivement. L'aspect en (C) de microvésicules en grappes est pathognomonique d'une échinococcose alvéolaire. (A-D) Service de Radiologie-Imagerie médicale, CHU Rennes.

Si l'imagerie permet d'orienter le diagnostic, celui-ci ne sera retenu qu'avec la mise en évidence directe ou indirecte du parasite. Il peut s'agir de la visualisation du parasite, par examen anatomopathologique d'une biopsie ou d'une pièce opératoire, ou sa détection par biologie moléculaire [21]. Il peut également s'agir d'un diagnostic indirect par mise en évidence d'anticorps IgG anti-*Echinococcus*. Les techniques les plus couramment utilisées sont les ELISA EgHF (antigène de fluide vésiculeux d'*E. granulosus*), non spécifique de l'espèce *E. multilocularis*, les ELISA Em2 (antigène de métacestode d'*E. multilocularis*) et recEm18 (antigène recombinant de protoscolex d'*E. multilocularis*), ce dernier étant considéré comme un marqueur de viabilité (mais dont la négativité n'est pas synonyme de lésion avortée). L'immuno-empreinte, technique la plus sensible, peut également être employée [27]. Il est également possible de détecter les IgG par hémagglutination indirecte (HAI) [28]. En France, il est recommandé d'associer pour le dépistage une HAI utilisant un antigène d'*E. granulosus* et un ELISA utilisant un antigène d'*E. multilocularis*, et en confirmation une immuno-empreinte [29].

F. Prise en charge thérapeutique

La prise en charge des EA repose avant tout sur l'exérèse chirurgicale radicale, seule méthode curative, et l'association à un traitement systémique au long cours par benzimidazolé : albendazole ou mébendazole [21]. L'imagerie étant insuffisamment sensible, des possibles tissus parasitaires résiduels peuvent être à l'origine de rechutes post-chirurgicales, ce qui justifie une administration longue de benzimidazolé (pendant au moins 2 ans) et une surveillance biologique et clinique du patient afin de détecter ces rechutes (pendant au moins 10 ans) [30]. De par l'analogie existante entre l'EA et les processus néoplasiques, l'exérèse chirurgicale suit les mêmes principes que ceux appliqués en oncologie, à savoir le respect d'une marge d'au moins 2 cm autour du tissu parasitaire détectable [21]. En cas de lésion inopérable, la prise en charge est palliative et consiste en un traitement à vie par benzimidazolé [21]. La progression et la rechute de l'EA étant favorisées sous traitement préventif du rejet de greffe, la transplantation hépatique doit être strictement limitée aux patients présentant une insuffisance hépato-cellulaire sévère, ne pouvant pas être pris en charge par hépatectomie partielle, et n'ayant pas de lésion secondaire extra-hépatique connue [21,31].

II. Réponse immune lors d'une échinococcose alvéolaire

A. Modèles expérimentaux animaux

Afin de mieux appréhender les études réalisées par le passé, il convient de revenir brièvement sur les différents modèles expérimentaux animaux existant pour l'étude de l'EA, leurs avantages et leurs inconvénients. Comme l'ensemble de la recherche en biologie, la vaste majorité des études animales portant sur l'EA sont réalisées sur des souris (*Mus musculus*). Cependant, il est important de noter la forte variabilité inter- et intra-spécifique dans la sensibilité à l'EA : par exemple les souris C57Bl/10 sont plus résistantes à l'infection que les souris AKR, DBA/2 et C57Bl/6, elles-mêmes plus résistantes que les souris BALB/c [12,32–35]. Les raisons de cette différence de sensibilité sont détaillées dans la section II.E. Outre l'hôte, différentes voies sont employées pour son infection (Tableau I). Celle qui suit au plus près le cycle évolutif naturel du parasite est celui de l'infection primaire, par ingestion d'œufs par gavage [36–38]. Cette méthode présente l'intérêt de mimer le mode de contamination de l'Homme, d'intégrer l'ensemble des étapes précédant le développement hépatique du métacestode et de pouvoir calibrer l'inoculum (nombre d'œufs déterminé par microscopie). Cependant cette méthode requiert l'obtention d'œufs, qui s'effectue (i) en récupérant les adultes de *E. multilocularis*

présents dans le tube digestif de renards sauvages infectés, eux-mêmes obtenus auprès de chasseurs durant la période de chasse [36], ou (ii) en isolant les œufs à partir des selles d'un hôte définitif infecté, possiblement élevé en captivité [12]. De plus, *E. multilocularis* étant un agent pathogène de groupe 3, la manipulation de sa forme infestante, l'œuf, nécessite de travailler dans des locaux et selon des modalités remplissant les exigences réglementaires des laboratoires de Niveau de Sécurité Biologique 3 (NSB3) [39].

Tableau I. Modèles expérimentaux animaux, avantages et inconvénients.

Mode	Stade	Similarités avec	Origine de	Inoculum	Maninulation	
d'administration	parasitaire	l'EA humaine ²	l'inoculum	quantifiable	Manipulation	Exemple
Gavage	Œuf	Mode de	Hd	Oui	Modérée	
		contamination,			Laboratoire	[37]
		localisation			NSB3	
Injection	Métacestode	Forme	Hi	Non	Facile	
intrapéritonéale ¹		infectieuse				[41]
Injection	Métacestode	Forme	Hi	Non	Difficile	
hépatique ³		infectieuse, localisation			(chirurgie)	[46]
	Protoscolex	Localisation	Hi	Oui	Difficile (chirurgie)	[47,49]

Hd hôte définitif, Hi hôte intermédiaire.

¹ ou sous-cutanée

² intérêt/inconvénient en fonction du projet de recherche

³ intra-portale, intra-hépatique ou sous-capsulaire

Une alternative plus accessible en termes de matériel biologique et de logistique est l'infection dite secondaire, par inoculation d'un broyat de métacestode permettant la formation de nouvelles lésions parasitaires. L'injection s'effectue le plus souvent dans la cavité péritonéale [40–43] mais peut également se faire par voie sous-cutanée [44]. Cette méthode, bien que ne mimant pas l'infection naturelle, permet de se focaliser sur la réponse contre le métacestode, stade envahissant le foie chez l'homme en évitant la phase d'invasion intestinale. Enfin, les dernières méthodes consistent à développer une infection hépatique à l'aide d'un geste chirurgical, que ce soit par inoculation d'un broyat de métacestode au niveau hépatique [45,46] ou l'injection de protoscolex (obtenus à partir de

lésions animales fertiles) dans la veine porte [47,48] ou au niveau de la capsule hépatique [49]. Ces méthodes requièrent une formation spécifique, mais permettent de mimer l'infection hépatique tout en s'affranchissant de l'obtention des œufs et de la phase d'invasion intestinale. Comparé à l'injection d'un broyat de métacestode, l'inoculation de protoscolex permet d'améliorer la répétabilité et reproductibilité des expériences en calibrant l'inoculum (nombre de protoscolex), mais présente l'inconvénient majeur de se baser sur une forme qui n'est, en pratique, presque jamais rencontrée chez l'Homme [50]. Les infections secondaires exigent d'avoir accès à des lésions parasitaires, qu'elles soient isolées d'un hôte intermédiaire sauvage, ou d'hôtes intermédiaires en captivité permettant d'entretenir la souche par repiquages successifs [45].

B. Lors de l'invasion

La réaction immune de l'hôte lors de l'invasion, que nous définirons ici comme la phase pré-hépatique du parasite, est la phase la moins bien décrite de l'EA. En 2021, l'équipe du Pr Ryo Nakao (Sapporo, Hokkaido, Japon) a montré que l'invasion survient dans les premières portions de l'intestin grêle, après éclosion des œufs et activation des oncosphères par les fluides intestinaux [51]. L'invasion semble rapide et transitoire puisque l'ADN du parasite est détectable dans le foie dès 2 h post-infection (p.i.) mais n'est plus détectable ni dans l'intestin grêle ni dans le colon 24 h p.i. L'ADN reste toutefois détectable dans les selles, suggérant que de nombreux oncosphères n'envahissent pas l'organisme et sont éliminés avec les selles. Une différence significative du nombre de copies d'ADN parasitaire était observée entre les deux fonds génétiques étudiés, DBA/2 et C57BI/6, à 4 h p.i. (intestin grêle et foie) et 24 h p.i. (foie et selles). Entre autres facteurs, ceci pourrait s'expliquer par une différence dans la réponse immune précoce, impactant la probabilité et l'intensité de l'infection. Cependant, cette explication reste hypothétique et aucune donnée expérimentale ne sont venues l'étayer jusqu'alors.

Des travaux ont également montré que les rats Wistar, naturellement résistants, peuvent développer une EA hépatique après ingestion d'œufs s'ils sont traités par corticothérapie systémique ou en cas d'agranulocytose chimio-induite [52–54]. De façon intéressante, les infections secondaires (par administrations parentérales de métacestodes) sont effectives chez le rat Wistar, et les rats déficients en lymphocytes T restent résistants à une infection par ingestion d'œufs [54]. Ces éléments suggèrent que les acteurs de l'immunité innée, et en particulier les polynucléaires, sont cruciaux dans l'élimination des oncosphères durant leur migration.

Si une sécrétion importante d'IgA et d'IgG anti-*E. multilocularis* a été décrite dans les fluides intestinaux de souris infectées par *E. multilocularis* [55], il n'existe actuellement aucune preuve scientifique que ceux-ci reconnaissent les oncosphères. Également, il convient de noter qu'il n'a jamais été rapporté d'incidence ou de sévérité accrues de l'EA chez les patients déficients en IgA [23,56,57], alors même

que le déficit sélectif en IgA et le Déficit Immunitaire Commun Variable (DICV) sont les déficits immunitaires congénitaux les plus fréquents dans la population [58]. Ces éléments suggèrent que la place de l'immunité humorale est négligeable dans l'EA.

Il est probable que d'autres populations cellulaires que celles évoquées ci-dessus soient impliquées, par exemple les lymphocytes NK et les mastocytes, activés lors de l'invasion par les oncosphères d'*E. granulosus* [59], mais aucune documentation supplémentaire n'est disponible pour *E. multilocularis*.

C. Phase précoce

La phase précoce, ou initiale, est caractérisée par l'établissement du parasite au niveau du foie, sa croissance lente, et la formation de granulomes périparasitaires. Aucune donnée concernant cette phase n'est disponible chez l'Homme. En effet, la maladie est diagnostiquée tardivement, et quand bien même elle serait diagnostiquée plus tôt, il serait impossible de formellement dater l'infection. Les données portant sur la phase précoce (1-2 mois p.i. chez la souris) sont donc uniquement issues de la recherche fondamentale et en particulier de l'expérimentation animale.

Les granulomes périparasitaires formés durant cette phase sont composés de nombreux lymphocytes et polynucléaires éosinophiles, accompagnés de macrophages (prenant parfois la forme de cellules géantes multinucléées) et de tissu conjonctif [34]. Initialement, le métacestode est uniquement au contact de macrophages et de polynucléaires éosinophiles de l'hôte par un syncytium de cellules indifférenciées [60]. Ces cellules dégénèrent et forment au contact du parasite une fine couche de cellules nécrotiques, elle-même partiellement isolée des tissus sains par des fibroblastes produisant une matrice extracellulaire fibreuse (Figure 5) [34,60]. Dans le même temps, le parasite synthétise sa couche stratifiée polysaccharidique, l'isolant de la nécrose et des cellules immunes [60,61].

Les lymphocytes recrutés dans le même temps sont majoritairement des lymphocytes T CD4⁺, mais sont également observés des lymphocytes B et T CD8⁺. Une étude animale basée sur l'infection primaire de souris sauvages, athymiques (déficit en lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺), MHC-II I-A^{β-/-} (déficit en lymphocytes T CD4⁺), MCH-I β 2-m^{-/-} (déficit en lymphocytes T CD8⁺), TCR- β ^{-/-} (déficit en lymphocytes T CD4⁺ $\alpha\beta$) et μ MT (déficit en lymphocytes B), a mis en évidence que la formation de ces granulomes était dépendante des lymphocytes T CD4⁺ $\alpha\beta$ et qu'elle permettait, au moins partiellement, de limiter le développement des lésions parasitaires [43].



Figure 5. Coupes histologiques de lésions murines précoces, coloration à l'hématoxyline et éosine.

(A) Granulome composé de lymphocytes, de macrophages, de polynucléaires éosinophiles et d'une cellule géante multinucléée, sans parasite visible. (B) et (C) Granulomes de composition similaire à (A), avec du matériel parasitaire visible (couches striée et germinale) et des cellules nécrotiques au contact du parasite, identifiables par leur noyau pycnotique. (D) Lésion plus avancée, comportant une discrète plage de nécrose caséeuse au contact du métacestode, isolée de l'infiltrat cellulaire par du tissu fibrotique. (A-D) Université Rennes 1.

Les macrophages semblent également impliqués dans le contrôle de l'infection durant cette phase, comme suggéré par une étude publiée en 2020 mettant en évidence un plus grand nombre de métacestodes hépatiques, à 2, 4 et 6 semaines après infection (injection intra-portale de scolex), chez des souris BALB/c déplétées en macrophages à l'aide de liposomes de clodronate [62]. Ce travail mettait également en évidence l'accumulation légèrement plus tardive des macrophages par rapport aux lymphocytes et polynucléaires (absents à 2 j p.i. et présents à partir de 5 j p.i.), et la présence d'un contingent au phénotype compatible avec celui de macrophages pro-inflammatoires « M1 » dérivés de monocytes (CD11b^{Hi}F4/80^{Int}iNOS⁺) [62]. Toutefois, la quantification de l'expression de gènes par RT-qPCR ne mettait en évidence qu'une faible induction du marqueur « M1 » *Nos2* accompagnée d'une importante induction de gènes « M2 » comme *Ym1, Retnla, Fizz1* et *Ccl22*, suggérant que l'effet anti-inflammatoire des cellules de Küpffer, macrophages résidents du foie, reste prédominant. De façon intéressante, il a été montré que les souris déficientes en *Nos2* (codant iNOS) présentaient des lésions plus petites que des souris sauvages, ce qui signifie que non seulement les macrophages recrutés depuis le compartiment sanguin ne parviennent pas à contrôler le développement parasitaire, mais

que la production de NO pourrait même le favoriser [63,64]. Les macrophages et l'étendue de leur spectre de polarisation restent insuffisamment explorés dans la physiopathologie de l'EA et d'autres travaux sont nécessaires afin de définir leur rôle dans le déroulement de l'infection.

La phase précoce est associée à une production de cytokines de l'immunité innée, telles que l'IL-12, le TNF- α et l'IL-6, ainsi que de cytokines Th1 comme IFN- γ et IL-2 [35,46]. Ces médiateurs induisent une réponse pro-inflammatoire, en particulier l'IL-12, le TNF- α et l'IFN- γ modulent l'activité des monocytes-macrophages en les orientant vers phénotype « activés classiquement » (M1) [65]. Ce profil correspond à des macrophages produisant des grandes quantités de cytokines proinflammatoires et dont les capacités antimicrobiennes et antitumorales sont accrues (production d'espèces réactives de l'oxygène et de NO). L'IL-12, l'IFN-y et l'IL-2 permettent l'initiation d'une réponse adaptative et la différenciation (sous stimulation antigénique) des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Th1, dont la principale caractéristique est la production d'IFN-γ [66]. L'IL-6 est un médiateur produit par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et connu pour ses effets pro-inflammatoires, étant capable d'induire la différenciation des lymphocytes Th17 et de réprimer la transcription de FoxP3, le facteur de transcription typique des lymphocytes anti-inflammatoires « Treg » [66]. L'implication de l'IL-12 durant la phase précoce de l'EA est connue de longue date, notamment grâce à l'aide d'un modèle murin d'infection hépatique traité par IL-12 recombinant concomitamment à l'infection [67]. Parmi les souris traitées par IL-12, 38% (6/16) ne présentaient aucun granulome hépatique à 10 semaines p.i., contre 0% (0/16) chez les non-traitées. Chez les souris traitées par IL-12 et présentant des lésions, la morphologie des métacestodes montrait des signes de dégénération, conjointement à une réaction immune périparasitaire plus intense.

D. Phase tardive

D'après les observations faites chez la souris, la croissance parasitaire durant l'EA suit une courbe biphasique : après une période de croissance ralentie, la taille des métacestodes augmente de façon exponentielle et des localisations secondaires métastatiques apparaissent à distance de la localisation primaire [34,35]. Ce changement s'accompagne de modifications progressives de l'environnement immunitaire observées chez la souris durant une période « intermédiaire » s'étendant d'environ 2 à 3 mois p.i. [46]. Durant cette période, tant au niveau local que systémique, l'expression des cytokines Th1 initialement produites (IFN- γ , IL-2, TNF- α) diminue, tandis que celle des cytokines Th2 (IL-4, IL-5) et T_{reg} (IL-10, TGF- β 1), connues pour médier la tolérance immune, augmente [34,35,46,68–70]. Chez l'Homme, les observations sont similaires avec, chez les patients avec une EA évolutive, une production spontanée d'IL-10 et d'IL-4 par les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), ainsi que d'IL-5 suite à une stimulation par un antigène d'*E. multilocularis* [71–73]. Il a été observé, *ex vivo* chez l'Homme comme *in vivo* chez la souris, qu'à un stade plus avancé de la maladie cet état prend la forme d'une immunosuppression avec abolition de la réponse à divers stimuli [74]. Ainsi, après stimulation par la concanavaline A, le LPS, différents extraits antigéniques de métacestode d'*E. multilocularis* (extrait total, fluide vésiculeux, surnageant de culture) ou encore dans un modèle de colite chimioinduite, la réponse des cellules mononucléées des individus atteints d'EA était réduite par rapport à celle de sujets sains [41,64,75–79].

Au niveau histologique, cette phase s'accompagne d'une importante nécrose dans le centre de la lésion parasitaire (Figure 6), ainsi que d'une fibrose hépatique sévère [80] et, chez la souris, d'une désorganisation des organes lymphoïdes primaires [81]. Le métacestode induit également une néoangiogénèse périparasitaire, avec formation de néovaisseaux dans l'infiltrat lymphoïde du granulome à partir de la fin de la phase précoce [82,83]. Peu d'études ont porté sur le sujet, mais il semble que le parasite tire bénéfice des néovaisseaux formés pour obtenir de l'oxygène et des nutriments, ce qui concorde avec l'observation que le traitement de souris infectées par de l'acide anacardique, un composé extrait du fruit d'*Anacardium occidentale* et inhibant la voie de signalisation du VEGF-A, réduit la taille des métacestodes [84]. Le mécanisme n'a pour l'instant pas été exploré, mais l'hypothèse la plus probable semble que l'hypoxie tissulaire périparasitaire, causée par la forte activité cellulaire, la nécrose et la fibrose, sont responsables d'une induction du facteur HIF-1 α , luimême responsable de l'expression de divers gènes, dont celui codant le VEGF-A [84–88].

Divers travaux ont également mis en évidence l'implication des lymphocytes T_{reg} dans le déroulement de cette phase. Les lymphocytes T_{reg} sont des lymphocytes T CD4⁺ exprimant le facteur de transcription FoxP3 et médiant la tolérance immune, en particulier par la production d'IL-10, de TGF- β 1 et d'IL-35 [89]. Le rôle de ces cellules dans l'EA a initialement été mis en évidence par l'observation d'une activité antiproliférative d'un contingent de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ [90]. Par la suite, il a été observé que l'expression de FoxP3 augmentait progressivement dans le foie de souris infectées, à partir de la fin de la phase précoce, conjointement avec celle du TGF- β 1 et d'IL-10, puis avec la proportion de lymphocytes T CD4⁺FoxP3⁺ circulants [91]. Enfin, d'autres travaux ont démontré que la déplétion en lymphocytes T_{reg} conduisait à un meilleur contrôle du développement parasitaire, se traduisant par des métacestodes plus petits et une meilleure réponse Th1/Th17 (IFN- γ , IL-17A) en parallèle d'une moindre production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [92,93].



Figure 6. Coupes histologiques de lésions humaines tardives, coloration à l'hématoxyline et éosine.

(A) Granulome typique des lésions humaines, composées de tissu fibronécrotique au contact du parasite, d'un anneau de cellules épithélioïdes séparées des cellules lymphoïdes par du tissu fibreux. (B) et (C) : avec la progression des lésions, le tissu fibronécrotique au contact du parasite s'étend pour ensuite repousser ou faire disparaître l'anneau de cellules épithélioïdes. (D) Au cœur des lésions les plus avancées, les tissus parasitaires sont dégénératifs, tandis que les tissus de l'hôte se résument à des plages de nécrose caséeuse comportant des foyers plus ou moins importants de calcifications azurophiles. (A-D) Service de Parasitologie-Mycologie médicale, CHU Rennes.

Une étude animale, basée sur un modèle d'infection péritonéale a démontré la responsabilité (au moins partielle) de FGL2, un médiateur protéique sécrété par les lymphocytes T_{reg}, dans leur activité [94]. Cette étude démontrait, *in vivo* et *in vitro*, que FGL2 est un médiateur capable d'inhiber la réponse Th1/Th17 et de favoriser la réponse Th2 au cours de l'EA. La concentration sérique d'IL-17A était corrélée à celle de FGL-2, et de façon intéressante, l'exposition de cellules spléniques à de l'IL-17A recombinante stimulait la sécrétion de FGL-2, tandis que les splénocytes de souris infectées (4 mois p.i.) délétées en FGL-2 produisaient significativement plus d'IL-17A que les souris sauvages. Ce phénomène s'apparente à un rétrocontrôle négatif de l'IL-17A, dont des concentrations trop élevées, en réponse à un phénomène inflammatoire intense, conduiraient à la sécrétion de FGL-2 qui régulerait cette production d'IL-17A. Ce mécanisme pourrait expliquer la variabilité de la corrélation entre les deux cytokines selon les modèles [95–97]. Certaines observations s'expliqueraient alors par l'insuffisance ou le débordement du système de rétrocontrôle, en fonction du processus pathologique.



Figure 7. Schéma explicatif du mécanisme d'action hypothétique de FGL2.

Le métacestode induit la libération d'IL-1 β , IL-17A, IFN- γ et TNF- α , dont les deux premiers sont connus pour favoriser l'expression de FGL2 par les lymphocytes T_{reg}. FGL2, par liaison aux récepteurs Fc γ RIIb et Fc γ RIII réprime la maturation des cellules dendritiques, la costimulation des lymphocytes T effecteurs, résultant en une diminution de la réponse Th1/Th17 et une augmentation de la réponse Th2. Extrait de [94].

L'implication de l'immunité Th17 reste mal connue dans l'EA. Les cytokines Th17 sont au nombre de 6, de l'IL-17A à l'IL-17F [98]. L'IL-17A et l'IL-17F, les acteurs les plus étudiés de la réponse Th17, modulent le comportement des tissus « barrières » de l'organisme (épiderme, muqueuses) en favorisant la production de peptides antimicrobiens et de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ) ainsi que la production et le recrutement de cellules myéloïdes, via l'expression de G-CSF, GM-CSF et CXCL8 par les cellules épithéliales et de l'immunité innée [99–101]. Ces cytokines agissent sur le même récepteur (hétérodimère IL-17RA/IL-17RC) et sont actuellement considérées comme induisant les mêmes voies de signalisation (transcription des facteurs C/EBPβ, AP-1 et NF-κB), avec une plus grande efficacité de l'IL-17A [98]. Durant l'EA hépatique murine, l'IL-17A a surtout été détectée au niveau sérique et hépatique à partir de la transition de la phase précoce vers la phase tardive [68,91,93,93,102]. Chez l'Homme, seules deux publications contradictoires rapportent des données sériques pour l'IL-17A et l'IL-17F. L'une décrit des concentrations plus élevées chez les patients atteints d'EA comparés à des contrôles sains [103], tandis que l'autre décrit des concentrations d'IL-17A similaires entre les groupes, et des concentrations d'IL-17F plus élevées chez les contrôles sains [104]. Bien qu'il soit actuellement impossible de définir formellement le rôle des IL-17A et IL-17F dans l'EA, ces cytokines sont hypothétiquement considérées comme protectrices en raison de leur activité promyéloïde et pro-réponse Th1. Des observations chez l'Homme pourraient être en accord avec cette hypothèse : la survenue d'EA à progression inhabituellement rapide chez des enfants atteints de Syndrome Hyper IgE (HIES) [105–107]. Les patients atteints de ce syndrome, le plus souvent dû à une mutation perte-de-fonction de STAT3, présentent un déficit de l'immunité Th17 qui les rend vulnérables aux infections bactériennes et fongiques [108,109]. La survenue d'EA à progression rapide chez ces patients à l'immunité Th17 déficiente suggère donc fortement un rôle protecteur de cette réponse dans l'EA humaine.

Il a été rapporté, chez les patients atteints d'EA, une altération de l'activité cytotoxique des lymphocytes NK [110] ainsi que de leur sécrétion de granzyme B, de perforine, d'IFN- γ et de TNF- α , conjointement à la sous-expression du récepteur activateur NKG2D, et la surexpression du récepteur inhibiteur KIR2DL1 [111,112]. Ce défaut de production de cytokines est également observé chez la souris infectée par *E. multilocularis*, alors associé à une surexpression des récepteurs inhibiteurs TIGIT ou NKG2A [113,114]. La déplétion de cellules NK chez des souris atteintes d'EA conduit à des lésions parasitaires plus grandes et moins de fibrose périparasitaire [114]. Ces éléments attestent du rôle protecteur au cours de l'EA des cellules NK, et de l'altération de leur capacité de réponse au cours de l'infection.

Enfin, la phase tardive de l'EA est également associée à la surexpression d'*immune checkpoints*, tels que PD-1 (cellules NK, T CD4⁺ et T_{reg}) et PD-L1 (cellules présentatrices d'antigènes) [115,116]. Ces marqueurs de surface, médiateurs de l'échappement immunitaire, sont principalement connus en tant que nouvelles cibles thérapeutiques dans la prise en charge de divers cancers [117]. Le blocage de l'interaction PD-1/PD-L1 dans l'EA semble prévenir l'échappement immunitaire et permet par conséquent de réduire la taille des métacestodes, de diminuer la réponse T_{reg} et d'améliorer la réponse Th1 [118,119].

E. Sensibilité et résistance à l'infection

Dans l'EA, il existe une forte variabilité interindividuelle. En effet, à partir de données sérologiques issues d'Europe centrale, il a été estimé que 80% des individus infectés éliminent complètement le parasite, près de 20% des individus infectés le neutralisent précocement dans son développement, conduisant à la formation d'une lésion calcifiée non-viable dite « avortée », et seulement moins de 1% des individus infectés développent une forme évolutive de la maladie, c'est-à-dire l'EA [120]. Comme évoqué précédemment, cette forte variabilité a bien été décrite chez les rongeurs, et la comparaison de souris de fonds génétiques sensibles, comme les C57Bl/6 et les BALB/c, à des souris de fonds génétiques me les C57Bl/10 et les A/J, a permis de mettre en évidence chez ces dernières un meilleure réponse médiée par l'IFN-γ et l'IL-2, ainsi qu'une hypersensibilité à médiation

cellulaire (de type IV ou retardée) plus importante [32,35]. D'autres observations ont mis en évidence le rôle protecteur de l'immunité Th1 et de l'hypersensibilité de type IV : la stimulation non spécifique de l'immunité cellulaire (vaccination BCG, phytohémagglutinine) permet une protection partielle contre l'EA [121,122]. De même, l'administration d'IL-12 recombinante au moment d'une inoculation intra-hépatique de métacestode permettait sa neutralisation précoce, aboutissant à la formation de lésions similaires aux lésions humaines avortées [67]. A l'inverse, des souris infectées par *E. multilocularis* déficientes en TNF- α et LT- α , ou traitées par ciclosporine, présentaient des lésions plus importantes et une hypersensibilité de type IV réduite, comme observé chez les souris déficientes en T CD4⁺ $\alpha\beta$ [40,43,123]. Le développement d'une fibrose périparasitaire , médié par l'hypersensibilité de type IV, permet de freiner le développement du parasite [47,82]. Toutefois il est également responsable de la dysfonction hépatique associée aux EA avancées (cholestase chronique, cirrhose parasitaire, syndrome de Budd-Chiari) [124].

Il est connu que les individus ayant une altération de l'immunité cellulaire acquise (principalement par des traitements immunosuppresseurs) peuvent présenter une forme d'EA à progression rapide et à fort risque de dissémination métastatique [31,125–129]. L'ensemble des cas d'EA chez les patients immunodéprimés a fait l'objet d'une revue de la littérature disponible en annexe de ce manuscrit (article en cours de révision pour le journal *Clinical Microbiology and Infection*). Quelques études de cohortes humaines ont permis de comparer les profils de cytokines et chimiokines entre les patients ayant une lésion évolutive et ceux ayant une lésion stable [28,71,72,130,131]. Comme chez la souris, il est constaté chez les individus résistants une plus faible expression d'IL-5 et d'IL-10 et une plus forte expression de TNF-α [71,72]. L'IFN-γ, pourtant considéré comme protecteur en raison de son rôle dans l'hypersensibilité de type IV, était également surexprimé chez les individus sensibles [71]. Cette observation fait écho à l'accélération de la croissance parasitaire observée lors de l'administration de fortes doses d'IFN-γ à des souris infectées [132]. Ces éléments mettent en évidence l'inefficacité de l'IFN-γ une fois le parasite établi, et même son rôle défavorable, probablement par réduction de la fibrose périparasitaire [132].

La grande majorité des chimiokines étudiées sont indifféremment exprimées entre individus sensibles et individus résistants [130], à l'exception du CXCL12, CCL26 (Eotaxine-3), CCL17 (TARC) et CCL2 (MCP-1), dont la production induite par l'exposition de PBMC à un extrait antigénique d'*E. multilocularis* semble plus importante chez les patients atteints d'EA active que chez les patients dont l'EA est stable [28,131]. La littérature indique que ces chimiokines sont impliquées dans des processus probablement favorables au développement de l'EA : CXCR4, le récepteur de CXCL12, est impliqué dans le recrutement de divers leucocytes mais est également dans la néoangiogénèse du microenvironnement tumoral [133]; CCR3, le récepteur de CCL26, médie le recrutement des polynucléaires éosinophiles [134] ; CCR4, le récepteur de CCL17, médie le recrutement de lymphocytes Th2 et T_{reg} [135]; CCR2, le récepteur de CCL2, est impliqué dans le recrutement de divers types cellulaires, dont les monocytes-macrophages et en particulier les Macrophages Associés à la Tumeur (TAM), connus pour leurs propriétés tolérogéniques [136]. Parmi ces récepteurs aux chimiokines, seul CCR2 a été étudié dans l'EA, confirmant son implication dans le recrutement de macrophages dérivés de monocytes circulants [62].

L'ensemble de ces données permet de dégager deux grands groupes d'acteurs dans la physiopathologie de l'EA : l'immunité Th1/Th17 associée à l'hypersensibilité de type IV (impliquant lymphocytes T CD4⁺ et macrophages) améliore le contrôle de l'infection, tandis que l'immunité Th2 et T_{reg} favorise son développement. Toutefois, une fois la phase tardive atteinte, aucun facteur immunologique permettant la neutralisation du parasite n'a été mis en évidence jusqu'alors. Ceci suggère que l'immunothérapie seule ne peut pas permettre la guérison des patients, mais qu'une potentielle synergie avec une chimiothérapie antiparasitaire conventionnelle soit possible. La figure 8 est une représentation schématique résumant les différentes phases de l'immunité au cours de l'EA et de l'efficacité de la réponse de l'hôte.



Figure 8. Schéma récapitulatif de la réponse immune au cours de l'échinococcose alvéolaire.

Après la contamination, les œufs libèrent un oncosphère qui traverse la muqueuse intestinale et gagne la circulation sanguine pour être stoppé au niveau du foie. Il s'y transforme en métacestode et induit une réaction immunologique de type IV avec formation d'un granulome périparasitaire impliquant des polynucléaires éosinophiles (PNE), des lymphocytes T CD4⁺ (LT) Th1/Th17 et des macrophages proinflammatoires M1 (M ϕ M1). Les individus résistants éliminent le parasite à cette étape. Chez les individus sensibles, une composante Th2 et T_{reg} s'ajoute à la réaction initiale, avec polarisation de macrophages en M2 tolérogènes. En phase tardive de la maladie, la réponse Th2/T_{reg} prédomine. Le parasite est entouré de nécrose, de fibrose et de néovaisseaux. Il croit alors de façon exponentielle et peut former des localisations secondaires à distance de l'atteinte initiale. La figure a été partiellement générée à l'aide de Servier Medical Art, fourni par Servier, sous licence Creative Commons Attribution 3.0 unported.

F. Immunomodulation par *Echinococcus multilocularis*

Comme tout helminthe parasite de l'Homme, *E. multilocularis* exprime des constituants capables de modifier la réponse immunitaire de son hôte (Tableau II). La plupart des études ont porté sur les effets du fluide vésiculeux, contenu dans les métacestodes, ou les produits excrétés/sécrétés (E/S). Les effets observés sur les cellules immunes sont variés, mais sont majoritairement favorables au parasite : la réponse cytokinique Th1 est diminuée, et la réponse Th2 augmentée [76,115,137–139], l'expression de molécules de costimulation (CD80 et CD86 par les cellules dendritiques, CD40 par les macrophages) est réprimée [137,140], la formation de lymphocytes T_{reg} et leur activité est favorisée [141] et l'expression des *immune checkpoints* est également induite par le parasite [115].

Stade parasitaire	Préparation	Cible	Effet	Référence	
Métacestode	Fluide vésiculeux	NK	PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3	[115]	
			ン CTLA-4		
		T CD4⁺	↗ PD-L1, CTLA-4		
		РВМС	PD-L1, CTLA-4, IFN-γ, TNF-		
			α, IL-4, IL-13		
Métacestode	Fluide vésiculeux	NK	ン CD69	[138]	
		РВМС	⊅ IL-17A (J3) et TGF-β1 (J6)		
Métacestode	Fluide vésiculeux	MoDC	ン CD80 ou CD86	[137]	
	Fluide vésiculeux + LPS	РВМС	⊅ TGF-β1		
Métacestode	Produits E/S et fluide	Chimiokine	Dégradation de l'éotaxine	[142]	
	vésiculeux				
Métacestode	Produits E/S, EmACT	T CD4 ⁺	Conversion en T _{reg} et <i></i> ↗ IL-10	[141]	
			(TGF-β1-dépendant)		
Métacestode	Produits E/S ou	РВМС	⊐ IL-12 et TNF-α	[76]	
	vésicules entières				
Métacestode	Glycosphingolipides	PBMC	prolifération et IL-2 צ	[143]	
Métacestode	Non applicable	Macrophages	⊻ CD80, CD86, CD40	[140]	
	(parasite entier)	péritonéaux	レ activation des LT		
Métacestode	Extrait total	Polynucléaires	↗ IL-4, IL-13, histamine	[139]	
		basophiles			
Culture primaire	EmTIP (protéine)	T CD4⁺	⊅ IFN-γ	[144]	
axénique					
Protoscolex	Non applicable	Macrophages	⊅ CD206	[145]	
	(parasite entier)		⊔ phagocytose		
Non précisé	Non précisé	Macrophages	↗ Arginase-1, IL-10	[146]	
			∖ IL-12, iNOS		

Tableau II. Résumé des propriétés immunomodulatrices directement imputables à Echinococcus multilocularis

LT lymphocytes T, MoDC cellules dendritiques dérivées de monocytes, PBMC cellules mononucléées du sang périphérique, produits E/S : produits excrétés/sécrétés

III. L'alarmine IL-33

A. Structure et sources

La première observation de l'IL-33 date de 2003, dans les noyaux des cellules endothéliales des HEV (High endothelial venules), des vaisseaux spécialisés dans l'accès des lymphocytes aux organes lymphoïdes [147–149]. La protéine native est composée de 270 acides aminés, et possède une structure en 3 domaines, l'un en N-terminal permettant sa liaison à la chromatine, le second, intermédiaire, comportant divers sites de clivage protéolytique, et le dernier en C-terminal étant un domaine conservé IL-1-like (Figure 9), permettant de classer cette cytokine dans la famille de l'IL-1 [150]. L'IL-33 est une alarmine (ou DAMP pour Damage Associated Molecular Pattern), contenue dans le noyau, libérée dans le milieu extracellulaire suite à la nécroptose [151] puis clivée en différentes formes plus actives sous l'action de protéases issues des neutrophiles (cathepsine G, élastase), des mastocytes (chymase, tryptase), voire des allergènes eux-mêmes [152-154]. La localisation intranucléaire de l'IL-33 a pour seul effet de contrôler la libération de cette cytokine dans le milieu extracellulaire [155]. L'IL-33 n'est donc pas un facteur de transcription, seule sa forme extracellulaire étant capable de modifier l'expression génique des cellules cibles, c'est-à-dire exprimant le récepteur ST2 [155,156]. Si certains auteurs ont suggéré qu'un épissage alternatif de l'ARNm codant l'IL-33 pourrait aboutir à la synthèse d'une forme tronquée, à localisation cytoplasmique et à sécrétion active [157,158], ces observations sont débattues et il n'est pas communément admis que l'IL-33 puisse avoir ni une localisation autre que nucléaire ni une libération autre que celle médiée par la nécrose [159]. Par ailleurs, il a été démontré qu'une altération de sa localisation nucléaire par délétion du domaine N-terminal conduisait à la génération de souris non viables, dont le décès était dû à un syndrome inflammatoire systémique intense [151,160].



Figure 9. Structure de l'IL-33.

L'IL-33 est composée de 3 domaines, l'un permettant sa localisation nucléaire, le domaine intermédiaire clivé par les protéases afin d'augmenter son activité, et le domaine conservé IL-1, responsable de son activité. Extrait de [159].

L'expression d'IL-33 a été détectée dans de nombreux types cellulaires, dont en particulier les cellules endothéliales (de façon constitutive chez l'Homme, inductible chez la souris [161]), les épithéliums (cutané, pulmonaire, digestif, vaginal [161]), des cellules stromales, en particulier les fibroblastes [150], et de façon plus anecdotique les oligodendrocytes [162,163]. Il n'est pas rare que certains auteurs rapportent d'autres sources cellulaires (macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, lymphocytes T_{reg} [164–167]), toutefois, ces populations sont des sources négligeables d'IL-33, voire même contestables [159].

L'IL-33 est une cytokine considérée comme orientant l'immunité vers un profil Th2, sans être nécessaire à sa mise en place [168]. Son administration à la souris par voie intra-péritonéale induit chez celle-ci une splénomégalie, une hyperéosinophilie et une élévation des taux d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 tissulaires et sériques [169]. En pratique, cette cytokine étant libérée localement suite à une agression tissulaire, son action est fortement dépendante du contexte biologique, selon sa(ses) source(s) cellulaire(s) et les cellules ciblées. En effet, l'effet de l'IL-33 varie grandement en fonction de la cellule activée et cette cytokine peut être à l'origine de processus anti-inflammatoires comme pro-inflammatoires et pro-angiogéniques (Figure 10) [150,156,170].



Figure 10. Multiples cibles de l'IL-33.

L'IL-33 est libérée de son compartiment nucléaire suite à une lésion tissulaire. De nombreux leucocytes ont été décrits comme cibles de l'IL-33, bien que les principaux soient ceux en lien avec l'immunité Th2. Modifié à partir de [171]

B. Le récepteur ST2

L'IL-33 se lie de façon spécifique à son récepteur ST2, également appelé IL-1RL1. La liaison de l'IL-33 à ST2 permet sa stabilisation et le recrutement d'IL-1RACP membranaire, dont l'association des motifs TIR cytoplasmiques à ceux de ST2 médie le recrutement de MyD88, puis d'IRAK, IRAK4 et TRAF6, aboutissant à la transcription de NF-κB ainsi que les MAP kinases JNK, p38 et Erk1/2 (Figure 11) [169]. ST2 est exprimé de façon constitutive par des leucocytes résidents tissulaires comme les mastocytes, les ILC2 (*group 2 innate lymphoid cells*) et les lymphocytes T_{reg}, qui sont les principales cibles de l'IL-33 [150]. Toutefois de nombreuses autres populations cellulaires peuvent exprimer ST2, qu'elles soient immunes (par exemple polynucléaires basophiles et éosinophiles, lymphocytes Th2, cellules dendritiques, macrophages [172–175]) ou non-immunes (par exemple cellules endothéliales, fibroblastes, astrocytes [150]). Ce récepteur existe sous une forme membranaire, ST2L, et sous une forme libre sécrétée, sST2, qui neutralise l'IL-33 extracellulaire (Figure 11) [176–178]. La forme sécrétée, codée par le même gène que la forme membranaire [179,180], est produite par divers types cellulaires, en particulier les cellules épithéliales bronchiques et pulmonaires ainsi que les cardiomyocytes [181].



Figure 11. Représentation de sST2 et de la voie de signalisation de l'axe IL-33/ST2L.

Afin d'activer sa voie de signalisation, le récepteur de l'IL-33, ST2L, recrute l'IL-1RAcP. Le ST2 existe sous une forme soluble sécrétée, ayant la fonction de récepteur neutralisant l'IL-33 extracellulaire. Extrait de [182].

C. Principales populations cibles

1. Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes T CD4⁺ Th2 ont été parmi les premières cellules décrites comme exprimant le récepteur ST2 [183,184]. Ces lymphocytes sont issus de l'interaction du TCR de T CD4⁺ naïfs avec un antigène porté par le CMH-II d'une cellule présentatrice d'antigène, en présence d'IL-4. La différenciation en lymphocyte Th2 se traduit par l'expression du facteur de transcription GATA3 et en conséquence par la production des cytokines caractéristiques de la réponse Th2 : IL-4, IL-5 et IL-13 [185–187]. Ces cellules peuvent être obtenues *in vitro* par coculture de lymphocytes T CD4⁺ avec des cellules présentatrices d'antigènes, possiblement activées par un allergène d'acarien, en présence d'IL-4 [188,189].

Leur exposition *in vitro* à l'IL-33 renforce la production d'IL-5 et d'IL-13 par rapport à des cellules non stimulées. Si l'expression d'IL-4 n'est pas directement induite par l'exposition des lymphocytes Th2 à l'IL-33, l'administration d'IL-33 à la souris conduit cependant à l'accumulation de lymphocytes Th2 IL-4⁺ [169,190]. Cet effet est donc vraisemblablement indirect, en raison de l'activité de l'IL-33 sur les autres populations cellulaires. Par exemple, l'IL-33 a été décrite pour induire la production d'IL-9 par les lymphocytes et polynucléaires basophiles [190,191]. Or l'IL-9 est une cytokine médiant la réponse Th2, particulièrement exprimée en situation d'allergie [192].

Il a récemment été démontré que parmi les lymphocytes Th2, les principales cibles sont les Th2 mémoires ST2⁺ (T_{RM} pour *Resident Memory T cells*). A l'opposé des lymphocytes Th2 effecteurs, ceuxci ont une forte expression membranaire de ST2 et leur exposition à l'IL-33 stimule une production importante d'IL-5 et, dans une moindre mesure d'IL-13, indépendamment d'une interaction antigène-TCR [193,194]. Les lymphocytes Th2 mémoires exposés à l'IL-33 produisent également de l'amphiréguline, médiateur capable d'interagir avec l'EGFR exprimé par les polynucléaires éosinophiles, recrutés lors des processus immunitaires Th2, et d'induire la sécrétion d'ostéopontine par ces cellules, contribuant significativement à la fibrogénèse [174].

2. Les lymphocytes T_{reg}

Les lymphocytes T_{reg}, comme décrit précédemment, sont des lymphocytes T CD4⁺FoxP3⁺ possédant des propriétés anti-inflammatoires et médiant la tolérance immune. Deux sous-types sont distingués : les *thymic* T_{reg} (tT_{reg}), issus de la différenciation thymique et sélectionnés pour leur TCR de haute affinité pour le soi, et les *peripheral* T_{reg} (pT_{reg}), générés hors du thymus lors d'une réponse inflammatoire persistante [195,196]. Un nombre croissant d'études documente une multiplicité des profils de pT_{reg}, exprimant des facteurs de transcription usuellement rencontré chez des Th différenciés (par exemple T-bet pour les Th1, GATA3 pour les Th2, RORyt pour les Th17) et dont la réponse anti-inflammatoire diffère selon le facteur exprimé [196,197]. Il a ainsi été démontré que les T_{reg} FoxP3⁺T-bet⁺ modulent préférentiellement la réponse Th1 [198], que les FoxP3⁺STAT3⁺ modulent la réponse Th17 [199], et que les FoxP3⁺RORyt⁺ modulent la réponse Th2 intestinale [200,201]. Les mécanismes exacts en jeu ne sont pas déterminés à l'heure actuelle, mais cette activité spécialisée pourrait reposer sur l'expression de récepteurs aux chimiokines, amenant ces sous-populations de lymphocytes T_{reg} à migrer spécifiquement sur certains sites d'inflammation [196,197,202,203].

De nombreuses études ont porté sur le rôle de l'IL-33 dans l'activité des lymphocytes T_{reg}, selon des méthodes et dans des contextes très variables [166,204–216]. L'ensemble de ces études s'accordent sur la capacité qu'a l'IL-33 à augmenter l'activité immunosuppressive des lymphocytes T_{reg} ST2⁺, mais ne mettent pas en évidence d'effet direct de l'IL-33 sur leur production d'IL-10 et de TGF- β 1 [166,204,206,209,210,212,213]. De nombreux travaux établissent une corrélation positive entre l'axe IL-33/ST2 et la proportion de lymphocytes T CD4⁺FoxP3⁺ [206–211,213,214,216], mais cette observation semble inconstante [166,204,215]. Enfin, certaines études font état d'une capacité de l'IL-33 à spécialiser la réponse des lymphocytes T_{reg} contre la réponse Th17, en agissant sur les lymphocytes Th17 ou sur la production d'IL-17A par les T CD4⁺ γ δ⁺ [208,212]. Les lymphocytes T_{reg} ont également un rôle dans la réparation tissulaire, notamment médié par l'IL-33, TCR-indépendante et sans lien avec leur fonction immunosuppressive. Chez les T_{reg} ST2⁺, l'exposition à l'IL-33 conduit à la sécrétion d'amphiréguline, permettant de réduire les lésions tissulaires dans un modèle murin d'infection par le virus de la grippe [217].

3. Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées, dénommées ILCs pour *Innate lymphoid cells*, constituent des équivalents des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ n'adaptant par leur reconnaissance antigénique par recombinaison génétique [218]. Les ILCs sont à distinguer des cellules T « préprogrammées » comme les iNKT (*invariant Natural Killer T cells*), MAIT (*Mucosa Associated Invariant T cells*), les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les T_{RM}, dont l'activation au sein des tissus mime celles des cellules de l'immunité innée, à la différence que celles-ci ont été préalablement sélectionnées sur la base de la reconnaissance antigénique par leur TCR. Trois groupes d'ILCs sont nommés par analogie avec les lymphocytes T CD4⁺ *helper* : les ILC1s expriment le facteur de transcription T-bet et produisent de l'IFN- γ , les ILC2s expriment les facteurs de transcription GATA3 et ROR α et produisent des cytokines Th2, et les ILC3s expriment le facteur de transcription te l'IL-17 et/ou de l'IL-22. Les lymphocytes *Natural Killers* (NK) et les LTi (*Lymphoid Tissue-inducer cells*) font également partie des ILCs (Tableau III) [218].

Tableau III. Caractéristiques des différentes cellules lymphoïdes innées.

A partir de [219].

Groupe	Facteur de transcription	Signal	Médiateurs libérés	Fonction
NK	T-bet, EOMES	IL-12, IL-18	IFN-γ, TNF-α, perforine, granzyme	Immunité : virus, bactéries, cellules tumorales
ILC1	T-bet	IL-12, IL-18	IFN-γ, TNF-α	Immunité : virus, pathogènes intracellulaires
ILC2	GATA3, RORα	IL-25, IL-33, TSLP	IL-4, IL-5, IL-13, IL-9, amphiréguline	Immunité : helminthes, réparation tissulaire, homéostasie
ILC3	RORγt	IL-1β, IL-23	IL-17A, IL-22	Immunité : bactéries extracellulaires, tolérance au microbiote
LTi	RORγt	IL-1β, IL-23	IL-17A, IL-22	Organogénèse

L'IL-33 agit sur les ILC2s, dont la vaste majorité exprime le récepteur ST2, et induit la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-13, IL-9 et d'amphiréguline, généralement en réponse à un helminthe ou dans l'allergie [150]. Les ILC2s, sous l'action de l'IL-33, modulent l'activité de autres populations cellulaires : elles sont capables de favoriser la fibrose hépatique par l'activation des cellules stellaires [220], de polariser les macrophages en AAM (Alternatively Activated Macrophages, ou « M2 »), de réguler l'activité des cellules NK via CD73 (déphosphorylation de l'ATP) [221] et de favoriser l'expansion des lymphocytes Treg [216]. Dans les organes (poumons, foie, rate, cerveau, pancréas, utérus), les ILC2s sont regroupées au sein d'espaces adventitiels périvasculaires, des espaces formant une gaine de liquide interstitiel et de collagène, contenant des cellules dendritiques, des lymphocytes T_{reg} et des cellules stromales [222,223]. Elles y sont au contact de cellules stromales productrices d'IL-33, dont elles stimulent l'expansion en cas d'inflammation Th2, et qui, à leur tour, potentialisent l'activité des ILC2s [222]. Les ILC2s sont également regroupées au niveau de la lamina propria des muqueuses, et du mésothélium des séreuses [222]. La distribution spatiale des cellules ILC2s semble être une variable importante de leur activité, en lien avec l'accès à l'oxygène. En effet, il a été démontré que l'hypoxie, par l'induction de facteur HIF-1 α , conduit à la répression de l'expression de GATA3 et de ST2, et par conséquent à la perte de réponse à l'IL-33 [224,225]. L'ensemble de ces éléments suggèrent donc une implication des ILC2s dans la tolérance immune médiée par l'IL-33, à la condition d'une vascularisation suffisante des tissus. Enfin, I'IL-33 semble pouvoir stimuler la production d'IFN-γ par les cellules NK après induction de l'expression de ST2 (sous un stimulus inflammatoire, par exemple l'inhalation de fumée de cigarette [226]), ces cellules n'exprimant que faiblement ce récepteur à leur état basal [150,188].

4. Les mastocytes

Les mastocytes ont été parmi les premières cellules décrites comme étant activées par la liaison de l'IL-33 au récepteur ST2 [169]. Ces cellules résidant dans les tissus, rares chez l'individu sain, augmentent en nombre chez les individus souffrant d'allergie chronique [227]. Elles médient chez ces derniers ainsi que ceux souffrant de mastocytose des effets délétères (cutanés, respiratoires, cardiovasculaires, digestifs) dus à la sécrétion de tryptase, d'histamine et à l'orientation de l'immunité vers un profil Th2 [228]. Les mastocytes peuvent être activés par la fixation d'IgE sur le récepteur FcERI (hypersensibilité de type I), voie historiquement décrite, mais également par les complexes immuns et leur fixation au FcyRI, par l'activation du complément (C3a, C5a), par les TLR ou par des agents pharmacologiques (substance P, MRGPRX2) [227]. De nombreuses études s'accordent sur la capacité de l'IL-33 à provoquer la sécrétion d'IL-6 et d'IL-13 par les mastocytes, et ceci de manière indépendante du récepteur FcɛRI [208,229–233]. Bien que moins prépondérantes, d'autres cytokines sont sécrétées par les mastocytes activés par l'IL-33, notamment TNF- α , MCP-1, CCL2, IL-1 β et IL-18 [230,231,234]. L'interaction entre IL-33 et mastocytes est décrite comme modulant le micro-environnement immunitaire, par exemple en polarisant les macrophages vers un profil M2 tolérogène [231,232]. Il a également été observé que l'IL-33 favorise la différenciation des lymphocytes T_{reg} FoxP3⁺RORyt⁺, connus pour moduler la réponse Th2 intestinale [200,201,208,233]. Également, il a été rapporté une induction de l'expression d'ICAM-1 par les mastocytes sous l'effet de l'IL-33, permettant une hypothétique activation des cellules dendritiques en phase initiale de l'inflammation [235].

5. Les monocytes-macrophages

Les monocytes-macrophages font partie des cellules pour lesquelles ST2 n'est pas exprimé à l'état basal, mais peut être induit par un contexte inflammatoire [159]. Si l'IL-33 ne permet pas par ellemême de polariser les macrophages en un phénotype M2, de nombreux travaux ont documenté sa capacité à favoriser la polarisation M2 *via* les autres populations immunes (en particulier les mastocytes, T_{RM} et ILC2s précédemment décrits), ou en potentialisant l'effet de l'IL-13 [236–241]. Les macrophages obtenus expriment alors un phénotype comportant des marqueurs classiques des macrophages M2, tels que l'arginase-1, YM-1, CD206 ou encore l'expression d'IL-10, mais ils sont également impliqués dans la prolifération des fibroblastes, la production de matrice extracellulaire, et d'une façon plus générale la fibrogénèse [236,238]. Il a été montré dans un modèle animal de lésions pulmonaires dues au naphtalène, que l'expression de ST2 était transitoire durant le processus de polarisation du macrophage, mais qu'elle permettait de modifier ses fonctions cellulaires, plus
précisément en renforçant ses capacités de remodelage tissulaire et sa production de certaines cytokines comme l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α [242].

6. Les polynucléaires

Les polynucléaires basophiles présentent de nombreuses analogies avec les mastocytes : ils expriment le FcɛRI, récepteur aux IgE, qui, lorsqu'ils sont activés, induisent la libération des médiateurs préformés comme l'histamine, et la production de cytokines Th2 comme l'IL-4 et l'IL-6 [243]. L'analogie est également valable pour l'expression de ST2, à la différence qu'elle est constitutivement faible chez les polynucléaires basophiles et augmentée en présence d'IL-3 [188,244]. En se liant à son récepteur, l'IL-33 induit chez ces cellules une sécrétion d'IL-4, d'IL-13 et de CXCL8 [244–247]. Également, l'IL-33 augmente l'adhérence des polynucléaires basophiles à la fibronectine, à ICAM-1 et VCAM-1, augmente leur capacité de migration vers l'éotaxine (présente à leur état basal *via* l'expression de CCR3), et favorise la dégranulation sous exposition à des IgE [247].

L'IL-33 est étroitement liée aux polynucléaires éosinophiles, comme en atteste l'hyperéosinophilie observée en cas d'administration d'IL-33 à la souris [169], ou, chez l'Homme, la survenue d'une œsophagite à éosinophiles en cas de duplication du gène codant l'IL-33 [248]. Les polynucléaires éosinophiles du sang périphérique, à leur état basal, n'expriment pas le récepteur ST2, toutefois, son expression peut être observée après induction *in vitro* par du GM-CSF ou chez les polynucléaires éosinophiles tissulaires [249,250]. La stimulation des polynucléaires éosinophiles ST2⁺ par l'IL-33 résulte principalement en une sécrétion de cytokines, chimiokines et médiateurs lipidiques, dont notamment IL-4, IL-6, IL-13, CCL1, CCL7 et LTC4 [250–255]. Malgré des modèles expérimentaux et des stimuli utilisés variables, la caractéristique la plus fréquemment observée après stimulation par l'IL-33 semble être la sécrétion d'IL-13, possiblement associée à celle d'IL-4 en contexte inflammatoire [249,250,253,255].

D. Implications dans des processus pathologiques

1. Cancers

De par sa capacité à induire un environnement tolérogène (immunité Th2, activation des T_{reg}, polarisation des macrophages en M2), l'IL-33 a été décrite dans de nombreuses études comme ayant un effet pro-tumorigénique, et ceci dans divers cancers solides (sein, colon, estomac, foie, poumons, pancréas...) et hémopathies malignes (syndromes myéloprolifératifs et lymphoprolifératifs) [206,232,256–261]. Dans la plupart de ces situations, l'IL-33 est responsable d'une répression de la réponse Th1/Th17 (IL-17A, IFN- γ) et d'une activité réduite des lymphocytes cytotoxiques NK et T CD8⁺, favorisant le développement tumoral [256]. Si cette activité peut être médiée par les lymphocytes T_{reg} (notamment en stimulant la production d'amphiréguline [206,260,261]) et les ILC2 [259,262], l'une des

principales caractéristiques de l'IL-33 mise en évidence dans les processus tumoraux est le recrutement de macrophages associés aux tumeurs ou TAM, dont le phénotype évoque celui des macrophages M2 (expression de CD206, CD163, arginase-1), au profil tolérogène et pro-angiogénique, contribuant ainsi à la mise en place du micro-environnement tumoral [232,258,263–265]. Diverses études ont été réalisées chez la souris afin d'évaluer l'efficacité d'anticorps anti-IL-33 ou anti-ST2 dans le traitement de cancers, dont les résultats semblent prometteurs [266]. Toutefois, l'IL-33 a ponctuellement été décrite comme ayant des effets antitumoraux (colon, poumons, glandes salivaires) [256,267], suggérant qu'une telle stratégie thérapeutique pourrait être adaptée selon les mutations acquises au sein de la tumeur [256,266].

2. Allergies

Les allergies sont un vaste ensemble d'entités cliniques dont la physiopathologie est basée sur une hypersensibilité du système immunitaire à un antigène généralement exogène, ou plus rarement endogène [268]. Elles incluent notamment l'atopie, une prédisposition à la sensibilisation contre de multiples antigènes usuellement non immunogènes, prenant la forme clinique d'asthme, de rhinite et conjonctivite allergiques, et de dermatite atopique. Les allergies sont le plus souvent associées à la synthèse d'IgE dirigées contre le ou les antigènes responsables, favorisées par la réponse Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) et les polynucléaires éosinophiles. Les manifestations aiguës (vasodilatation, œdème, bronchoconstriction) sont dues à l'interaction des IgE avec le récepteur FcERI présent à la surface des mastocytes, polynucléaires basophiles et polynucléaires éosinophiles, entraînant leur dégranulation et la synthèse de médiateurs lipidiques (leucotriènes et prostaglandines), de cytokines et de chimiokines [269]. L'IL-33, en favorisant l'immunité Th2, la production d'IL-4, IL-5, IL-13 et le recrutement de polynucléaires éosinophiles, est étroitement liée aux mécanismes allergiques [270,271]. Ainsi, des polymorphismes des gènes codant IL-33 et ST2 ont été associés à la survenue d'asthme et de dermatite atopique chez l'Homme [272]. Également, dans un modèle expérimental d'asthme induit par la sensibilisation à l'ovalbumine chez la souris, la délétion du gène codant l'IL-33 conduit à un moindre recrutement de cellules immunitaires au niveau des voies respiratoires, dont les polynucléaires éosinophiles et neutrophiles, acteurs majeurs dans la physiopathologie de l'asthme [273]. L'IL-33 est un puissant potentialisateur, voire inducteur, des réponses des polynucléaires basophiles, des mastocytes et des ILC2, qui semblent être les principales populations ciblées par cette cytokine dans ce contexte [272,274–276]. L'IL-33 agit également sur les cellules stromales et épithéliales, notamment en favorisant le remodelage tissulaire et en entretenant un environnement inflammatoire [277]. Des essais cliniques ont évalué l'astegolimab, un anticorps monoclonal anti-ST2, dans le traitement de la dermatite atopique et de l'asthme, et l'itepekimab, un anti-IL-33, dans le traitement de l'asthme. Si l'astegolimab n'a montré que peu voire pas d'effet par rapport au placebo, l'itepekimab présentait une efficacité ainsi qu'une tolérance similaire à une autre spécialité sur le marché, le dupilumab, un anti-IL-4 [278–280].

3. Maladies inflammatoires et auto-immunes

Ces maladies regroupent les maladies inflammatoires chroniques (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), spondylarthrite ankylosante, sarcoïdose...), et les maladies autoimmunes, caractérisées par une perte de tolérance au soi (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux systémique...). De nombreuses études ont porté sur la relation entre IL-33 et maladies inflammatoires et auto-immunes, concluant parfois à un rôle délétère, parfois un rôle protecteur, selon la pathologie étudiée et le modèle expérimental [281,282]. Ces observations diverses peuvent s'expliquer par la multiplicité des rôles de l'IL-33, à la fois anti-inflammatoire, pro-inflammatoire Th2, voire parfois pro-inflammatoire Th1 [150,281]. Il est toutefois intéressant de noter que certains polymorphismes de ST2 ou d'IL-33 sont associés à la survenue de pathologies inflammatoires et auto-immunes thyroïdiennes et rhumatologiques [283,284], suggérant une implication de l'axe IL-33/ST2 dans ces pathologies. D'autres travaux sont à réaliser afin de mieux déterminer celle-ci.

4. Maladies infectieuses

Si l'IL-33 a été décrite comme impliquée dans quelques infections bactériennes et virales dans lesquelles elle possède généralement une activité bénéfique pour l'hôte (excepté les virus des hépatites B et C pour lesquels elle favorise la fibrose hépatique) [285], c'est pour son rôle dans l'immunité contre les helminthes qu'elle a principalement été décrite. L'IL-33 est depuis longtemps connue pour favoriser l'élimination des nématodes intraluminaux chez la souris, phénomène initialement décrit avec Trichuris muris, puis Nippostrongylus brasiliensis et Strongyloides venezuelensis [286–288]. Le mécanisme est multiple, car il repose sur les ILC2s et leur capacité à activer les mastocytes par l'IL-9 et à polariser les macrophages vers un profil « M2 » [289,290], mais également sur les cellules entérochromaffines, qui libèrent de la sérotonine et augmentent la motilité intestinale afin de favoriser l'expulsion du parasite [291]. Ces modèles expérimentaux de nématodoses intestinales ont permis de faire des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes d'immunomodulation des helminthes. Il a notamment été mis en évidence que Heligmosomoides polygyrus, un nématode intestinal de rongeur, est capable de sécréter le Hp-TGM, un homologue du TGF-β1 favorisant l'activité des lymphocytes T_{reg} [292], mais également HpARI, une protéine permettant de réduire l'activité de l'IL-33 en l'empêchant de se détacher de la chromatine ou de se lier à son récepteur [293]. A l'opposé, il a été mis en évidence que l'infection par ce nématode entraîne la fixation de radicaux N-acétylglucosamine, notamment sur STAT6, ce qui est à l'avantage de l'hôte : la modification de ce facteur de transcription entraîne l'expression de la gasdermine C qui permet la sécrétion d'IL-33, mécanisme nouvellement décrit de libération de cette cytokine dans le milieu extracellulaire [294–296].

L'IL-33 n'a pas toujours été décrite comme protectrice contre les helminthes (Figure 12). En particulier, cette cytokine semble avoir des effets délétères sur l'hôte en cas d'helminthose intratissulaire : elle favorise l'accumulation de polynucléaires éosinophiles dans le système nerveux central lors d'une infection à *Angiostrongylus cantonensis* [297,298], elle induit une réponse Th2 inefficace et délétère durant la toxocarose viscérale (disséminée) à *Toxocara canis* [299], et de nombreuses études rapportent son implication dans la fibrose du granulome hépatique au cours de la bilharziose à *Schistosoma mansoni* ou *Schistosoma japonicum* [252,300–304].



Figure 12. Les rôles multiples de l'IL-33 au cours des maladies infectieuses.

En raison de son principal effet inducteur de la réponse Th2, l'IL-33 permet généralement la réparation tissulaire et l'élimination des helminthes intraluminaux. Cette cytokine a donc généralement un rôle protecteur, excepté face à certains germes intracellulaires et des parasites tissulaires, pour lesquels elle va favoriser le développement d'une réponse inefficace. D'après [285]. La figure a été partiellement générée à l'aide de Servier Medical Art, fourni par Servier, sous licence Creative Commons Attribution 3.0 unported

IV. Chimiothérapie de l'échinococcose alvéolaire : état des .

connaissances

A. Méthodes d'évaluation des composés antiparasitaires

1. Approches *in vitro*

Avant d'évoquer les différentes molécules étudiées pour le traitement de l'EA, il convient de décrire les méthodes expérimentales disponibles pour évaluer l'efficacité de molécules candidates. Les premières méthodes *in vitro* d'évaluation de composés antiparasitaires contre *E. multilocularis* reposaient sur l'obtention de protoscolex à partir de lésions animales fertiles [305], ou sur la culture de métacestodes *in vitro*, aboutissant à l'obtention de vésicules parasitaires [306]. Les formes parasitaires obtenues étaient exposées aux composés et l'activité de ceux-ci était appréciée sur la morphologie des éléments, la diminution du nombre de vésicules, ou la survie des éléments, évaluée à l'aide d'un colorant vital (bleu de méthylène, éosine) [307,308] ou l'inoculation à l'animal [309]. Excepté l'inoculation à l'animal, ces méthodes reflètent mal l'activité parasiticide des principes actifs car elles ne permettent pas d'évaluer l'activité sur les cellules germinatives, à l'origine des rechutes. De plus, elles reposent sur une évaluation visuelle qualitative (morphologie) ou semi-quantitative (proportion d'éléments parasitaires prenant une coloration) subjective.

Afin de pallier ces défauts, un test quantitatif d'évaluation de l'efficacité in vitro a été mis au point en 2010 par l'équipe du Pr Andrew Hemphill de la Vetsuiss Faculty à Bern (Suisse) : le test de l'activité de la phosphoglucose isomérase (PGI). Ce test repose sur la détection indirecte de l'activité enzymatique de l'EmPGI, une enzyme produite par le métacestode d'E. multilocularis, contenue dans le fluide vésiculeux et la couche germinale [310]. Cette enzyme, restreinte à l'intérieur de la vésicule en situation normale, est relarguée dans le milieu extérieur à la suite d'une lésion mécanique ou d'une exposition à un composé antiparasitaire actif [311]. Le test consiste à quantifier l'enzyme dans le surnageant de culture de métacestodes exposés à un composé testé. La détection se fait par mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 340 nm, de façon continue pendant 30 min, reflétant la génération de NADH,H⁺ après ajout de glucose-6-phosphate déshydrogénase, de NAD et de fructose-6-phosphate (Figure 13). La cinétique de génération du NADH, H⁺ est proportionnelle à la quantité d'EmPGI. Le résultat est obtenu en rapportant la quantité d'EmPGI dans le surnageant à la quantité d'EmPGI dans la totalité du puits (après broyage des vésicules), puis est exprimé en pourcentage d'activité par rapport au témoin positif, le Triton X-100, qui lyse les métacestodes. Ce test permet notamment de définir la concentration efficace 50 (CE50) d'un composé, et, étant miniaturisable en plaques de culture 24, 48 ou 96 puits, permet d'effectuer des tests de criblage ou de relation structureactivité [312]. Il s'agit de la méthode in vitro à détection objective la plus utilisée dans la littérature (Tableau IV).



Figure 13. Schéma explicatif du test de la phosphoglucose isomérase.

(A) Ce test repose sur la détection d'une enzyme contenue à l'intérieur du parasite, l'EmPGI, et relarguée dans le milieu extérieur suite à une exposition à un composé antiparasitaire actif. (B) La détection s'effectue par dosage enzymatique, à l'aide d'un mix réactionnel contenant du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et du fructose-6-phosphate ajouté extemporanément. En présence de PGI, le fructose-6-phosphate est converti en glucose-6-phosphate, qui est converti en 6-phosphogluconol-acétone par la G6PD, avec réduction simultanée du NAD en NADH,H⁺, détecté par spectrophotométrie grâce à son absorption à 340 nm.

Un test similaire, basé sur la détection d'une phosphatase alcaline relarguée par les métacestodes d'*E. multilocularis* (EmAP) [313], est utilisée par certains auteurs [314–317]. Dans ce test, le surnageant de culture des métacestodes est ajouté à un tampon contenant un substrat de la phosphatase alcaline, la pNPP (paranitrophénylphosphate). En cas d'EmAP relargué par le parasite, ce qui témoigne d'une activité antiparasitaire du composé testé, la pNPP est transformée en paranitrophénol coloré. La réaction est quantifiée par mesure de l'absorbance à 405 nm après 30 min d'incubation à 37°C. Le résultat est directement exprimé par l'absorbance à 405 nm. Si ce test est une alternative simple au test du PGI, celui-ci présente l'inconvénient majeur de quantifier le produit formé en point final, ce qui n'est pas directement proportionnel à la quantité d'enzyme. Également, le résultat obtenu n'est pas normalisé par la quantité d'enzyme totale dans le puit, ni par rapport à une référence, ce qui apporte une source de variabilité supplémentaire et rend difficilement réalisable la comparaison inter-essai.

Le test à la résazurine (test d'Alamar) a aussi été employé, à partir de métacestodes [318] ou de culture primaires de cellules germinatives [319]. Ce test est basé sur la réduction de la résazurine en résofurine par les mitochondries des cellules vivantes. La détection peut être effectuée par spectrophotométrie, les deux composés ayant un spectre d'absorption différent, ou par fluorimétrie, la résofurine fluoresçant à 590 nm pour une longueur d'onde d'excitation à 530-560 nm. Cette technique est peu sensible lorsqu'elle est réalisée sur des broyats de métacestodes, car elle ne reflète pas l'activité sur les cellules souches de la couche germinale mais sur l'ensemble des types cellulaires présents. Quant au test d'Alamar sur culture primaire de cellules germinatives, il reflète mal la réalité biologique, ces cellules étant isolées du milieu extérieur par la couche stratifiée acellulaire [320]. En remplacement du

test d'Alamar, la viabilité des cultures de cellule germinatives a parfois été évaluée par la biais d'une quantification de l'ATP par chimiluminescence (technologie CellTiter-Glo[™], Promega) [318,337,347,348].

Deux publications ont également évalué la viabilité de métacestodes exposés à un composé par une RT-qPCR ciblant le gène *Em14-3-3* d'*E. multilocularis*, en normalisant son expression par celle du gène codant l'actine parasitaire [321,322]. L'expression de gène reflétant la viabilité du parasite, une répression de l'expression d'*Em14-3-3* par un composé antiparasitaire est assimilée à une efficacité de ce composé.

Méthode	Stade employé	Technique de	Normalisation	Références	
d'évaluation		mesure	du résultat		
Morphologie, tests d'exclusion	Métacestode, protoscolex	Vision humaine	Non applicable	[307–309,323– 337]	
Test du PGI	Métacestode	Spectrophotométrie	Oui	[312,318,331,338– 344]	
Activité de l'EmAP	Métacestode	Spectrophotométrie	Non	[314–317,345]	
Test d'Alamar	Métacestode ou culture primaire de cellules germinatives	Spectrophotométrie ou fluorimétrie	Non	[318,333,346]	
Quantification de l'ATP	Culture primaire de cellules germinatives	Chimiluminescence	Non	[318,337,347,348]	
RT-qPCR <i>Em14-3-3</i>	Métacestode	qPCR	Oui	[321,322]	

Tableau IV. Comparaison des méthodes d'évaluation in vitro de l'activité anti-E. multilocularis.

2. Approches in vivo

L'activité des composés contre *E. multilocularis* peut être évaluée *in vivo*, ce qui permet de prendre en compte les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques inhérents à l'organisme entier et la voie d'administration du médicament. L'infection peut être secondaire, par inoculation de

métacestode ou de protoscolex, se faisant alors généralement par voie intrapéritonéale [349] ou plus rarement par voie sous-cutanée [343] ou intra-hépatique [350], ou primaire, par ingestion d'œufs [349]. L'efficacité est alors généralement mesurée sur le poids des lésions, ou parfois sur leur volume. L'infection humaine étant très majoritairement hépatique, les meilleurs modèles sont ceux conduisant à la formation d'une lésion hépatique chez l'animal utilisé, car les plus proches d'un point de vue pharmacocinétique. Toutefois, ces modèles étant contraignants (nécessité d'obtenir des œufs ou d'un geste chirurgical, cf. Tableau I), les composés sont fréquemment évalués dans une situation d'infection secondaire péritonéale ou sous-cutanée

B. Antiparasitaires conventionnels

Comme décrit précédemment, la pris en charge actuelle de l'EA repose sur l'exérèse chirurgicale de la lésion, actuellement seule méthode curative, associée à une chimioprophylaxie pré- et postchirurgicale par un benzimidazolé, préférentiellement l'albendazole, ou à défaut le mébendazole [21]. L'activité des benzimidazolés sur Echinococcus multilocularis a été largement décrite , que ce soit à l'aide de modèles expérimentaux in vitro (étude de l'impact sur la morphologie et le pouvoir infectieux de métacestodes ou de protoscolex d'E. multilocularis) [309,323,324], in vivo [351,352] ou de cas humains [353,354]. L'usage de benzimidazolés a permis de réduire l'infectiosité des formes parasitaires exposées à ces composés in vitro, et de stopper ou de ralentir la progression de l'EA lors de l'administration à des organismes infectés [338,351,352], permettant chez l'Homme une amélioration considérable de la survie (l'espérance de vie des EA sévères traitées est de plus de 10 ans, contre moins de 2 ans pour les non traitées) [353,354]. Toutefois, ces molécules ne sont que parasitostatiques et non parasiticides : si le parasite n'a pas été éliminé chirurgicalement, l'arrêt du traitement conduit à une reprise de la croissance parasitaire [352,353]. De plus, les benzimidazolés présentent un mauvais profil pharmacocinétique, en particulier une absorption mauvaise et/ou variable, voire une métabolisation rapide, prévenant l'utilisation de la plupart d'entre elles en médecine humaine [352,354,355]. Les benzimidazolés agissent par inhibition de la polymérisation des microtubules, en se liant à la tubuline [356]. Leur sélectivité pour les microtubules parasitaires est étroitement liée à la composition en acides aminés de la tubuline, en particulier le résidu 200 qui, chez les helminthes sensibles, est une phénylalanine, et pour lequel une mutation faux-sens conduisant au remplacement par une tyrosine (résidu généralement codé chez les mammifères) confère une résistance [357]. Il est intéressant de noter que la tubuline la plus exprimée par E. multilocularis, et en particulier par les cellules germinatives de la forme métacestode, est Tub-2, dont le résidu 200 est une tyrosine, ce qui pourrait expliquer l'incapacité des benzimidazolés à éliminer le parasite [358–361].

L'activité de l'albendazole a également été démontrée comme étant liée au statut immunitaire de l'hôte. En effet, il a été rapporté, chez l'Homme, que le traitement par albendazole conduit à un plus

fort recrutement cellulaire périparasitaire (lymphocytes T CD4⁺ et B, plasmocytes, macrophages) ainsi qu'une diminution de l'expression de FGL-2, médiateur sécrété par les lymphocytes T_{reg} [362]. De plus, il a été décrit chez la souris athymique que l'albendazole n'avait pas d'effet antiparasitaire [363], suggérant que cet effet repose au moins en partie sur un système immunitaire fonctionnel. A l'opposé, le traitement par albendazole réduit l'inflammation hépatique chez la souris, évaluée par la concentration tissulaire en IL-1 β , IL-6, TNF- α et IFN- γ [364], et chez l'Homme, les patients immunodéprimés souffrant d'EA sont décrits comme répondant plus rapidement au traitement, avec une régression rapide de la taille des lésions [56]. Ces observations sont à mettre en relation avec la complexité de la réponse immune dans l'EA, dont une suppression totale conduit à l'absence de contrôle de la croissance parasitaire, mais dont, *a contrario*, une réponse Th1/Th2 excessive telle qu'observée en phase tardive conduit à la formation de la fibrose périparasitaire, limitant l'accès des principes actifs au parasite.

Il est à noter que si les benzimidazolés sont généralement bien tolérés, la durée des traitements chez les patients atteints d'EA (2 ans post-chirurgie, à vie pour les formes inopérables) augmente le risque de survenue d'effets indésirables : des troubles digestifs, une alopécie, et surtout une hépatotoxicité prenant généralement la forme d'une hépatite cytolytique immuno-induite, à risque de récidive à la réintroduction du traitement et pouvant le contre-indiquer [365]. De plus, l'albendazole est tératogène en prises répétées durant le premier trimestre de grossesse [366,367], nécessitant des mesures de contraception efficaces lors du traitement. Ceci complexifie la prise en charge des désirs de grossesse chez les femmes atteintes d'EA, l'arrêt du traitement étant à risque de reprise de la croissance parasitaire. Ceci est d'autant plus risqué que l'état hormonal de la femme enceinte est suspectée de favoriser le développement du métacestode [368,369].

C. Traitement de sauvetage : amphotéricine B

En cas de contre-indication aux benzimidazolés, le seul traitement actuellement considéré comme envisageable est l'amphotéricine B par voie IV, déoxycholate ou liposomale, sans que son utilisation soit formellement recommandée [21]. Ceci repose sur l'observation *in vitro* d'une activité parasitostatique de l'amphotéricine B qui permet la diminution du nombre de vésicules en culture, qui réapparaissent à l'arrêt du traitement [325]. Chez des patients contre-indiqués pour les benzimidazolés, l'amphotéricine B a permis une réduction de l'activité métabolique mesurée au PET scanner et une stabilisation de la taille des lésions [107]. La formulation employée semble avoir son importance, l'amphotéricine B sous forme de dispersion colloïdale étant inefficace dans un modèle d'infection intrapéritonéale chez la souris [370]. De même, une interaction a lieu avec l'albendazole, l'administration simultanée de ces traitements ayant une activité réduite *in vitro* [371]. L'intérêt de ce traitement est limité en thérapeutique humaine, car s'il peut permettre une stabilisation de la maladie chez certains patients, une progression des lésions peut être observée chez d'autres (2/6 patients traités par amphotéricine B liposomale de 2008 à 2021 dans une série de cas pris en charge à l'hôpital universitaire d'Ülm, Allemagne) [106,372].

D. Autres molécules évaluées

Parmi les molécules candidates pour le développement de nouvelles chimiothérapies contre *E. multilocularis*, la méfloquine se distingue des autres par le nombre de résultats encourageants publiés [312,339,340,373]. Cette molécule, est déjà bien caractérisée chez l'Homme en tant que chimioprophylaxie antipalustre. Elle présente une forte activité parasiticide *in vitro* contre *E. multilocularis*, avec une CE50 de 30 µM au test du PGI [339,340]. Cependant, la méfloquine s'est révélée peu efficace par voie orale à 25 mg/kg 2 fois par semaine, mais un dosage à 100 mg/kg ou par voie intrapéritonéale réduit la taille des parasites de façon similaire à l'albendazole voie orale [312,339,373]. Toutefois, 12 semaines de traitement par voie orale étaient insuffisantes pour détruire le parasite, les lésions recueillies étant capables de réinfecter d'autres souris par sub-inoculation intrapéritonéale [373]. Si le mécanisme d'action de la méfloquine sur *E. multilocularis* n'est pas encore déterminé, il semble être lié au métabolisme du fer. En effet, il a été montrée que la méfloquine se lie à la ferritine et la cystatine du parasite [373]. En parallèle, des études de relation structure-activité ont démontré la nécessité d'un radical aminé et d'un radical -CF₃ pour que des dérivés de la méfloquine soient actifs [312].

Depuis la description de sa forte activité in vitro contre E. multilocularis en 2003, la nitazoxanide est longtemps apparue comme une alternative envisageable pour le traitement de l'échinococcose alvéolaire. Comme la méfloquine, celle-ci est déjà utilisée en médecine humaine et montre une efficacité in vitro contre les métacestodes d'E. multilocularis avec une CE50 à 1,4 μM [311,314,335,338]. Toutefois, l'évaluation de la nitazoxanide in vivo chez la souris a montré une efficacité moins importante (poids moyen des lésions 2,5 g) que l'albendazole (poids moyen des lésions 1,8 g) dans un modèle d'infection secondaire péritonéale (poids moyen des lésions de souris non traitées 4,3 g) [349]. Son efficacité a également été évaluée dans un modèle d'infection primaire hépatique, dans lequel il a été montré un plus faible nombre de lésions dans le groupe traité par la nitazoxanide (2,2 lésions/souris en moyenne) par rapport au groupe sans traitement (5 lésions/souris en moyenne), sans que la taille ni le poids des lésions ne soit évoqué [349]. La nitazoxanide a été utilisée dans le traitement de patients présentant une contre-indication pour les benzimidazolés et a montré une activité négligeable. En effet, le traitement par nitazoxanide a permis la stabilisation de l'EA chez un seul des 7 patients décrits dans la littérature, les 6 autres étant en échec de traitement ou ayant dû l'interrompre prématurément en raison des effets indésirables [106,372,374]. Ces observations tournent la page quant à sa possible utilisation en clinique, du moins en l'état [106,375]. De nombreux autres composés ont été testés contre *E. multilocularis*, avec des méthodes très variables et des résultats peu comparables. Ceux-ci sont résumés dans le Tableau V. La plupart de ces composés peuvent être classés parmi les agents anti-infectieux, les antinéoplasiques ou les composés extraits de plantes.

Tableau V. Autres composés évalués contre les formes larvaires d'*Echinococcus multilocularis*.

La concentration efficace à 50% (CE₅₀) est donnée pour les tests *in vitro* lorsque précisé dans l'étude, à défaut est donnée la concentration utilisée ou celle à partir de laquelle un effet est observé. L'effet par rapport à l'albendazole est précisé pour les études *in vivo*.

	Tasts d'évoluation in	Modèle					
Molécule		d'évaluation	Référence				
	VITO	in vivo					
Anti-infectieux							
DB1127 (dérivé		Secondaire	Actif in vitro (CE ₅₀ =6,1				
dicationique de	PGI	néritonéal	μM) et <i>in vivo</i> par voie IP	[340,341]			
pentamidine)		pentoneai	(=ABZ) mais pas <i>per os</i>				
Rupanyaguone	PGL et résorurine	Secondaire	Actif in vitro (CE ₅₀ =2,9	[246]			
Buparvaquone	FOI et l'esazurine	péritonéal	μM) mais pas <i>in vivo</i>	[346]			
Atovaguana	Viabilitá do DSC	Primaire	Actif in vitro (50 $\mu M)$ et in	[220 220]			
Atovaquone	Viabilite de FSC	hépatique	<i>vivo</i> (<abz)< td=""><td>[328,329]</td></abz)<>	[328,329]			
	PGI et résazurine,	Secondaire	Actif in vitro (CE ₅₀ =1,2	[210]			
	viabilité de CPCG	péritonéal	μM) mais pas <i>in vivo</i>	[210]			
Clarithromycine	Viabilité de	Non réalisé	Actif in vitro (12 uM)	[226]			
Clantin Onlycine	métacestodes	Nonrealise		[550]			
Artésupate et		Secondaire	Actif in vitro (40 $\mu M)$ et in				
dihydroartémisining	EmAP	néritonéal	<i>vivo</i> seulement en	[345]			
unyurbarternisinne		pentoneai	synergie avec l'ABZ				
Itraconazole			Actif <i>in vitro</i> (1 mM)				
Artéméthor cochefuncino	Viabilité de						
miltofocino, rifompicino	métacestodes	Non réalisé	Inactife in vitro	[335]			
miterosine, mampicine,							
cottimoxazole	Viabilitá do		Nolfinavir actif <i>in vitro</i>				
Inhibiteurs de protéase du	métacostados at do	Secondaire		[220]			
VIH		péritonéal	(CE50-29 HIVI) et 111 VIVO	ເວລບງ			
	43C		(=ABZ)				

	Antinéo	plasiques			
			Actif <i>in vitro</i> (nilotinib		
Nilotinih ovorolimus	PCI	Secondaire	CE_{50} =77 μ M, everolimus	[242]	
Nilotinib, everoninus	- 61	sous-cutané	CE_{50} =33 μ M) mais pas in	[545]	
			vivo		
	Morphologie de				
Imatinih	métacestodes,	Non réalisé	Actif in vitro (25 uM)	[207]	
inatino	viabilité de CPCG et	Nonrealise		[307]	
	de PSC				
	Morphologie de	Secondaire	Actif <i>in vitro</i> (10 μM		
Afatinib, U0126	métacestodes,	néritonéal	afatinib, 200 μΜ U0126)	[326]	
	viabilité de PSC	pentonear	et <i>in vivo</i> (=ABZ)		
BI 2536	Viabilité de CPCG	Non réalisé	Actif <i>in vitro</i> (10 nM)	[334]	
	Viabilité de		Vincristine et navelbine		
Vincristine, navelbine,	métacestodes	Non réalisé	actifs in vitro (0,1-60 nM),	[376]	
méthotrexate	(inoculation)		méthotrexate favorise la		
	(croissance parasitaire		
Docetaxel, paclitaxel,	Viabilité de		Docetaxel (2-10 μ M) et		
doxorubicine, vorinostat,	métacestodes	Non réalisé	paclitaxel (2-10 μ M) actifs	[377]	
navelbine	(inoculation)		in vitro		
Bortézomib	PGI	Secondaire	Actif in vitro (CE ₅₀ =0,6	[344]	
	-	péritonéal	μM) mais pas <i>in vivo</i>	L- J	
Inhibiteurs de PIM kinases :	Morphologie de				
SGI-1776, CX-6258	métacestodes,	Non réalisé	Actif <i>in vitro</i> (10 μM)	[337]	
	viabilité de CPCG				
	Exposition de	Secondaire	Actif <i>in vitro</i> (5 μM) mais		
2-methoxyestradiol	métacestodes et RT-	péritonéal	pas in vivo	[321]	
	qPCR <i>Em14-3-3</i>				
2-désoxy-D-glucose	EmAP	Secondaire	Actif <i>in vitro</i> (80 μM) et <i>in</i>	[317]	
		péritonéal	vivo (=ABZ)		
3-bromopyruvate	EmAP	Secondaire	Actif <i>in vitro</i> (40 μM) et <i>in</i>	[315]	
		péritonéal	vivo (=ABZ)	-	
Lonidamine	EmAP	Non réalisé	Actif <i>in vitro</i> (40 μM)	[378]	

	Composés ex	traits de plan	tes	
Osthole	Non réalisé	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vivo</i> (=ABZ)	[379]
Ampelopsine	EmAP	Non réalisé	Actif <i>in vitro</i> (40 μM)	[316]
Thymol	Viabilité de PSC	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (67 μM) et <i>in</i> <i>vivo</i> (=ABZ)	[380,381]
Carvacrol	Viabilité de métacestodes	Secondaire péritonéal	Potentialise l'ABZ <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	[332]
Crocine	PGI, viabilité de PSC et de CPCG	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (CE ₅₀ =11,4 μM) et <i>in vivo</i> (=ABZ)	[347]
	Αι	utres		
Metformine	Viabilité de CPCG et de PSC	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (10 mM) et <i>in vivo</i>	[333]
Endochin-like quinolones	PGI et résazurine, viabilité de CPCG	Non réalisé	Série de composés actifs in vitro (CE ₅₀ =0,2-1,7 μ M)	[348]
Vérapamil	Non réalisé	Secondaire hépatique	Actif <i>in vivo</i> (=ABZ)	[350]
Thiaclopride	PGI et viabilité de PSC	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (5 μM) et <i>in</i> <i>vivo</i> (=ABZ)	[331]
Isoprinosine, inosine, L- Phe-Phe-Ome	Viabilité de PSC	Non réalisé	Actifs <i>in vitro</i> (inosine et L-Phe-Phe-Ome CE ₅₀ ≈50 μM, isoprinosine CE ₅₀ ≈250 μM)	[308]
R-propylamine	Viabilité de PSC	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (20 μM) et <i>in</i> <i>vivo</i> (=ABZ)	[327]
Complexes du ruthenium	PGI	Non réalisé	Actif <i>in vitro</i> (CE ₅₀ =1,4-4,7 μM)	[342]

ABZ albendazole, CPCG culture primaire de cellules germinatives, EmAP mesure de l'activité phosphatase alcaline, IP intrapéritonéale, PGI test de la phophosglucose isomérase, PSC protoscolex, =ABZ effet équivalent à celui de l'albendazole, >ABZ effet supérieur à celui de l'albendazole, <ABZ effet inférieur à celui de l'albendazole.

E. Nouvelles formulations thérapeutiques

La vectorisation par nanoparticules s'est imposée ces deux dernières décennies comme une innovation majeure dans l'administration des molécules [382]. Celle-ci repose sur des formulations de 1 à 1000 nm d'un composé d'intérêt, afin de modifier ses caractéristiques pharmacocinétiques. En fonction du

type de nanoparticule, le principe actif peut être lié à sa surface, encapsulée dans un cœur hydrophile ou hydrophobe, ou encore piégé dans la matrice composant la nanoparticule. On distingue classiquement trois grandes catégories de nanoparticules : les nanoparticules lipidiques, polymériques et inorganiques (Figure 14) [383]. Actuellement, encore peu de spécialités relevant de la nanothérapeutique sont validées pour être administrées à l'Homme [384]. Celles-ci sont principalement destinées à la vectorisation d'un médicament (surtout des antinéoplasiques), et quelques formulations inorganiques sont indiquées pour la supplémentation en fer, pour l'imagerie médicale et pour la thérapie photothermique. Toutefois, d'autres utilisations sont en cours de développement et d'évaluation comme la thérapie génique ou l'immunothérapie [382].



Figure 14. Représentation schématique des types de nanoparticules.

Figure extraite de [383]. Ce schéma illustre la diversité des formulations nanoparticulaires. Au-delà de la dichotomie entre nanoparticules organiques, c'est-à-dire polymériques et lipidiques, et inorganiques, il existe une grande diversité de matériaux et d'assemblages possibles.

Si les nanoparticules présentent de manière très générale des avantages et inconvénients propres à leur composition (Tableau VI), il existe désormais de nombreux moyens d'optimiser leurs propriétés, par exemple en modifiant leur structure de surface (par exemple augmentation de la demi-vie par ajout d'un revêtement de polyéthylène glycol (PEG)), leur taille ou leur forme. Il est également possible d'adresser les nanoparticules aux cellules cibles, afin d'augmenter leur efficacité tout en réduisant

leurs effets indésirables. Pour cela il est possible de greffer à la surface des nanoparticules un anticorps ou un récepteur se liant sélectivement à un antigène ou un ligand.

Tableau VI. Résumé des	différentes nanoparticules	à visée thérapeutique.
	•	• •

Inspiré de [382–384]. Appréciation semi-quantitative : - mauvais, + faible, ++ moyen(ne), +++ très élevé(e).

	Exemples de	Tolárance Stahilitá		Coût	Utilisations actuellement
	nanoparticules	TOTETATICE			validées par la FDA
	Liposomes				
	Nanocapsules		+/-		
Lipidiques	Nanoparticules	+++		+/++	Vectorisation de principes actifs
	lipidiques solides				
	Emulsions				
	Micelles polymériques	++		++ +/++ Vectorisation	
Dolumáriques	Polymersomes				Vactorization de principae actife
Polymenques	Nanosphères		++		vectorisation de principes actirs
	Dendrimères				
	0-				Vectorisation de principes actifs
Inorganiques	Gran Sam	,			Supplémentation en fer
	Fer	+/-	+++	+++	Imagerie médicale
	SIIICE				Thérapie photothermique

Une grande partie des nouvelles formulations de chimiothérapie antiparasitaire pour le traitement de l'EA repose sur l'utilisation de nanoparticules pour vectoriser le principe actif et ainsi améliorer sa pharmacocinétique [385–391]. La première étude sur le sujet date de 1993 et portait sur l'efficacité de la doxorubicine couplée à des nanoparticules de polyisohexylcyanoacrylate dans un modèle murin d'infection secondaire hépatique [385]. Le traitement n'impactait alors pas la taille des lésions, même si les lésions étaient moins viables, comme en atteste la plus faible proportion de gerbilles (*Meriones unguiculatus*) infectées par sub-inoculation des métacestodes prélevés sur les souris. Dans les années 1990, une autre étude portant sur la vectorisation a évalué l'activité d'albendazole formulé en nanoparticules de poly-D,L-lactide, également dans un modèle murin d'infection secondaire hépatique [386]. La formulation, efficace à faible dose, devenait inefficace à forte dose. Ce phénomène pouvait s'expliquer par la toxicité de ces nanoparticules sur les macrophages. Quatre études ont évalué l'efficacité de l'albendazole formulé en liposomes, dont trois démontraient que la formulation liposomale était au moins aussi efficace que l'albendazole en comprimés dans des modèles d'infections

secondaires péritonéales. L'une d'entre elles montrait également que le traitement pouvait être potentialisé par l'association à la cimétidine, un inducteur enzymatique accélérant la transformation de l'albendazole en son métabolite actif, l'albendazole sulfoxyde [387–389]. La dernière de ces quatre études rapportait une série de patients souffrant d'EA complexe et pris en charge dans la province du Xinjiang (Chine) et traités par une formulation liposomale d'albendazole [390]. Les auteurs concluaient à une amélioration de 75% des patients (9/12) et une inefficacité pour les 25% restant (3/12), mais l'absence de comparaison à un groupe traité par albendazole seul empêche de formuler des conclusions définitives sur ces observations. Les nanoparticules de chitosan, un polyoside dérivé de la chitine, semble également fonctionnelle pour traiter l'infection parasitaire, permettant une plus grande activité de l'albendazole par rapport à la forme comprimés [388]. Enfin, une étude récente a porté sur la vectorisation d'un nouveau principe actif, un alcaloïde extrait de la Fabaceae Sophora moorcroftiana nommé E2-a, à l'aide de nanoparticules magnétiques composées de PLGA (poly-acide lactique co-glycolique) et d'atomes de fer [391]. La formulation était aussi efficace que l'albendazole par voie orale dans le traitement d'infections secondaires péritonéales. Les autres stratégies chimiothérapeutiques pour le traitement de l'EA sont rares et n'incluent que des variations de formulation galénique de benzimidazolés visant à en améliorer l'absorption digestive comme des dispersions solides [392–394], une formulation à base de chlorhydrate d'albendazole et d'hydroxypropyl méthylcellulose [395], une émulsion [396] et une suspension huileuse [397] destinés à la voie orale. Si l'on compare aux travaux concernant l'échinococcose kystique à *E. granulosus*, pour laquelle la problématique de biodistribution et de passage de la couche stratifiée est la même, d'autres formulations nanoparticulaires ont été évaluées : des nanoparticules lipidiques solides [393,398–402], des nanocapsules lipidiques [403,404], des nanoparticules polymériques (chitosan, PLGA-PEG (polyéthylèneglycol), PLGA-chitosan, méthoxy-PEG-polycaprolactone) [405-408] et des nanoparticules métalliques, ne vectorisant pas de principe actif [409-415].

AXE 1 : ROLE DE L'IL-33 DANS L'ECHINOCOCCOSE ALVEOLAIRE

I. Contexte et objectifs

L'IL-33, bien que possédant des fonctions pléiotropiques, est principalement associée à une orientation Th2 de l'immunité et une suppression de l'immunité Th1/Th17 par activation des lymphocytes T_{reg}. Ces voies étant décrites comme favorisant le développement de l'échinococcose alvéolaire en phase tardive, l'hypothèse à l'initiative de ce travail de thèse était que l'IL-33 endogène contribue au développement du parasite. Mes travaux de recherche ont donc eu pour objectif principal de déterminer si l'IL-33 était effectivement favorable au développement du parasite, et pour objectifs secondaires de décrire les différences de réponses immunitaires en présence et en absence d'IL-33 et de proposer des pistes de mécanismes pouvant les expliquer. Pour cela, j'ai disposé de souris IL-33^{-/-} utilisées par l'équipe pour des travaux antérieurs et initialement obtenues auprès du Pr Jean-Philippe Girard de l'Université de Toulouse, et nous avons obtenu du matériel parasitaire auprès de nos collaborateurs de Bern (Suisse), les Pr Britta Lundstroem-Stadelmann et Pr Bruno Gottstein, que nous entretenons depuis *in vivo* par infections successives de souris BALB/c.

II. Résumé

Au cours de l'EA, le stade larvaire d'Echinococcus multilocularis se développe dans le foie où une réponse initiale Th1/Th17 peut conduire à son élimination chez les individus résistants. Chez les individus sensibles à l'infection et à la maladie, une réponse Th2 se met en place plus tardivement, conduisant à la tolérance au parasite. Le rôle de l'IL-33, une alarmine libérée durant la nécrose et connue pour orienter l'immunité vers une réponse Th2, n'a pas encore été décrite dans l'EA. Des souris C57BI/6J sauvages (WT, wild-type) et IL-33^{-/-} ont été infectées par inoculation intrapéritonéale de métacestodes d'E. multilocularis et euthanasiées 4 mois plus tard, soit la phase tardive de la maladie en modèle murin. Les cellules immunitaires péritonéales et infiltrant le foie ont été immunophénotypées par cytométrie en flux multiparamétrique. Le dosage multiplex des cytokines dans le sérum et les lavages péritonéaux a été effectué par cytométrie de flux avec la technologie LEGENDplex[™]. L'IL-33 a été dosée dans les tissus murins et humains par ELISA. Des marquages immunofluorescents pour l'IL-33, le CD31 et le FoxP3 ont été réalisés sur des coupes de foies humains atteints d'EA. Les lésions observées chez les souris IL-33^{-/-} étaient plus petites que chez les souris WT. L'IL-33 était détectée dans les tissus entourant les métacestodes des souris WT, mais pas dans les sérums murins et humains. Chez les souris infectées, l'IL-33 endogène modifiait la polarisation des macrophages péritonéaux et le profil cytokinique. Les cytokines sériques Th2 (IL-4, IL-5) étaient corrélées positivement à la masse des lésions parasitaires chez les souris WT mais pas chez les souris IL-33^{-/-}. Dans ce modèle murin, l'IL-33 était associé à une accélération de la croissance parasitaire possiblement due à la polarisation des macrophages en M2 tolérogènes et à la libération de cytokines

51

anti-inflammatoires comme IL-10 et TGF-β1. Chez les patients atteints d'EA, les concentrations d'IL-33 étaient plus élevées en périphérie de la lésion parasitaire qu'à distance de la lésion. Les marquages immunofluorescents des coupes de foies humains infectés ont montré que les sources principales d'IL-33 étaient les cellules endothéliales CD31⁺ des néovaisseaux périparasitaires, présents au sein de l'infiltrat lymphoïde du granulome périparasitaire, tout comme les lymphocytes T_{reg} FoxP3⁺. Nous pouvons conclure que l'IL-33 est une alarmine clé dans la physiopathologie de l'EA qui médie l'effet tolérogène de la réponse systémique Th2. Ces résultats offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de l'EA, par la neutralisation de l'IL-33, possiblement en association avec l'administration d'albendazole.

III. Article

2	
3	Brice Autier ^a , Christelle Manuel ^b , Britta Lundstroem-Stadelmann ^c , Jean-Philippe Girard ^d ,
4	Bruno Gottstein ^e , Jean-Pierre Gangneux ^a , Michel Samson ^b , Florence Robert-Gangneux ^{a*} ,
5	Sarah Dion ^{b*#}
6	^a Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et
7	travail), UMR_S 1085, Rennes, France
8	^b Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) -
9	UMR_S 1085, Rennes, France
10	^c Institute of Parasitology, Department of Infectious Diseases and Pathobiology, Vetsuisse Faculty,
11	University of Bern, Bern, Switzerland
12	^d Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, UPS,
13	Toulouse, France
14	^e Institute of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland
15	
16	*Contributed equally.
17	
18	Running title: IL-33 accelerates alveolar echinococcosis
19	
20	Corresponding author: Sarah Dion; <u>sarah.dion@univ-rennes1.fr</u> ; +33(0)223234517
21	Keywords: IL-33, Echinococcus multilocularis, alveolar echinococcosis, angiogenesis, ST2, IL-
22	1RL1
23	Abstract word count: 248
24	Manuscript word count: 4806

Endogenous IL-33 accelerates metacestode growth during late-stage alveolar echinococcosis

25 ABSTRACT

26 During the course of the infectious disease alveolar echinococcosis (AE), the larval stage of 27 Echinococcus multilocularis develops in the liver where an initial Th1/Th17 immune response may 28 allow its elimination in resistant individuals. In patients susceptible to infection and disease, a Th2 29 response sets up later, inducing tolerance to the parasite. The role of IL-33, an alarmin released 30 during necrosis and known to drive a Th2 immune response, has not yet been described during AE. Wild-type (WT) and IL-33^{-/-} C57Bl/6J mice were infected by peritoneal inoculation with E. 31 32 multilocularis metacestodes, euthanized 4 months later and their immune response analyzed. 33 Immunofluorescence staining and IL-33 ELISA were also performed on liver samples from human patients with AE. Overall, metacestode lesions were smaller in IL-33^{-/-} than in WT mice. IL-33 was 34 35 detected in periparasitic tissues, but not in mouse or human serum. In infected mice, endogenous IL-36 33 modified peritoneal macrophage polarization and cytokine profile. Th2 cytokine concentrations were positively correlated with parasite mass in WT, but not in IL-33^{-/-} mice. In human AE, IL-33 37 38 concentrations were higher in parasitic tissues than in distant liver parenchyma. The main sources of 39 IL-33 were CD31⁺ endothelial cells of the neovasculature, present within lymphoid periparasitic infiltrates together with $FOXP3^+ T_{regs}$. In the murine model, periparasitic IL-33 correlated with 40 41 accelerated parasite growth putatively through polarization of M2-like macrophages and release of 42 immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF- β 1. We concluded that IL-33 is a key alarmin in AE 43 that contributes to the tolerogenic effect of systemic Th2 cytokines.

44 **IMPORTANCE**

45 The infection with the metacestode stage of *Echinococcus multilocularis*, known as alveolar 46 echinococcosis (AE), is the most severe cestodosis worldwide. However, less than 1% of exposed 47 individuals, in which immunity is not able to control the parasite, develop the disease. Factors 48 responsible for this interindividual variability are not fully understood. In this *in vivo* study

49	comparing wild-type and IL-33 ^{-/-} infected mice, together with data from human clinical samples, we
50	determined that IL-33, an alarmin released following tissue injury and involved in pathogenesis of
51	cancer and asthma, accelerates the progression of the disease by modulating the periparasitic
52	microenvironment. This suggests that targeting IL-33 could be of interest for management of patients
53	with AE, and that IL-33 polymorphisms could be responsible for increased susceptibility to AE.

55 INTRODUCTION

Alveolar echinococcosis (AE) is a widespread zoonosis caused by the parasite Echinococcus 56 57 multilocularis, a cestode infecting the intestine of wild foxes and a wide range of canids. The 58 ingestion of parasite eggs, spread in the environment through fox droppings, and possibly 59 contaminating food and water, leads to AE, one of the most lethal and severe helminthic diseases in 60 humans (1). After translocation through the digestive tract, the parasite mainly infects the liver. 61 There, the parasite forms a heterogeneous mass consisting of parasitic microcysts called 62 metacestodes (2), host connective tissue, immune cells and blood vessels. In susceptible hosts, the 63 larval metacestode indefinitely continues to grow until death of the host. Further, it is capable of 64 spread via metastases, thereby forming secondary lesions in others organs (3). Due to this clinical 65 presentation, the typical imaging, and the risk of recurrence, AE is often compared to cancer (4). 66 During the early stage of infection, the parasite triggers the recruitment of myeloid cells, such as 67 polymorphonuclear cells, monocytes and dendritic cells, which initiate a pro-inflammatory Th1/Th17 68 adaptative response (5, 6). In most of human infections (99% of cases as shown in Central European 69 countries), this pro-inflammatory response is able to control the parasitic development, leading to 70 parasite clearance or abortion of an established lesion (7). However, in less than 1% of cases, 71 immunity then switches to a mixed Th1/Th2 phenotype and expands its T_{reg} component, which 72 allows parasite survival and accelerates metacestode growth (8, 9). 73 IL-33 is a nuclear cytokine of the IL-1 family, which is released upon cellular damage (10). It

interacts with the receptor ST2 (also called IL-1RL1), naturally expressed by tissue-resident immune
cells such as mast cells, type-2 innate lymphoid cells (ILC2) and T_{reg} lymphocytes (10), as well as
circulating immune cells such as Th2 cells and eosinophils (11). However, ST2 expression can be
induced in many cell types, including neutrophils and macrophages (10). IL-33 is mostly described to

4

78	have "tole	rogenic"	effects, a	as it ca	n induce	Th2	immunity,	it can	also reg	gulate pi	o-infl	ammatory
		<u> </u>								/ I		

reaction through T_{reg} activation, and polarize macrophages into a "M2" phenotype (12–14). However,

80 the roles of IL-33 are pleiotropic and depend on the source and the location of inflammation, and the

81 presence/absence of a systemic inflammation (15). In infectious diseases, IL-33 can be either

82 deleterious, as it induces inflammation and fibrosis against helminths (16, 17) and tolerance against

83 intracellular parasites such as *Leishmania* (18, 19), or beneficial, as it has anti-inflammatory

84 properties and protective effects against intestinal helminths (20–22).

85 This study aimed at describing the role of IL-33 in AE, using an in vivo model of peritoneal 86 infection. As IL-33 has been shown to promote Th2 and Treg activity, we hypothesized that it could 87 be involved in late stage tolerance and/or anergy. Therefore, we studied a 4-month course of infection in wild-type (WT) and IL-33^{-/-} mice. We showed that IL-33 favors metacestode development in mice. 88 89 Findings are consistent with a local role of IL-33, as ST2⁺ cell populations are recruited at the site of infection (T CD4⁺ cells, macrophages, neutrophils, eosinophils) and IL-33 is detected in periparasitic 90 91 tissues, but not in sera. We also showed in hepatic biopsies of human patients with AE that IL-33 is 92 expressed in periparasitic neovasculature tissue, suggesting that parasite growth could be associated 93 with IL-33 release upon endothelial damage.

94

95 **RESULTS**

96 Endogenous IL-33 favors metacestode growth in vivo

97 To evaluate the role of IL-33 in the AE development, *E. multilocularis*-infected IL-33^{-/-} mice and

98 control WT littermates were analyzed after 4 months p.i. At this late stage of infection, peritoneal

99 metacestodes that developed in the WT mice had a higher weight ($m=12.1\pm5.6$ g) compared to those

100 that developed in the IL-33^{-/-} mice (m=7.7 \pm 3.5 g, p \leq 0.05) (Figure 1A). This higher growth rate was

101	confirmed by the weight of the whole mice, which was significantly higher in the WT group
102	compared to the IL-33 ^{-/-} group, at 14 and 18 weeks p.i. ($p \le 0.01$ and $p \le 0.001$ respectively) (Figure
103	1B). Expression of the parasitic $Em14$ -3-3 gene, a metacestode viability marker, was reduced in the
104	IL-33 ^{-/-} group (p ≤ 0.01) (Figure 1C). Hepatic secondary lesions were observed in 16.7% (2/12) and
105	13.3% (2/15) of mice in WT and IL-33 ^{-/-} groups, respectively ($p=1.0$, Fisher's exact test).
106	Metacestodes took the shape of heterogeneous microcystic structures intermingled with host
107	connective tissues in both groups (Figure 1D). IL-33 was not detectable in mouse sera at 4 months
108	p.i., but was detected in tissues surrounding the metacestodes of WT mice (m=406.2 \pm 185 ng/g of
109	protein, n=5, Supplementary data).
110	Endogenous IL-33 induces a tolerogenic phenotype in the periparasitic microenvironment
111	Immune populations in the peritoneum were characterized by multiparametric flow cytometry.
112	Peritoneal infection by E. multilocularis led to an important recruitment of monocyte/macrophages (p
113	\leq 0.001 and p \leq 0.05 for WT and IL-33 ^{-/-} mice, respectively), other myeloid cells (p \leq 0.01) and NK
114	cells (p \leq 0.01), together with a concomitant decrease of the resident B cells (p \leq 0.01), equally in both
115	WT and IL-33 ^{-/-} groups, compared to uninfected mice (Figure 2A). Proportions of other cell

116 populations were not significantly different between groups. The infiltrate of myeloid cells was

117 mainly composed of monocytes/macrophages, neutrophils, and, to a lesser extent, eosinophils and

118 dendritic cells, without significant differences between WT and IL-33^{-/-} mice (Supplementary data).

119 The proportion of CD206⁺ monocytes/macrophages was significantly decreased in IL-33^{-/-} mice

120 (Figure 2B, p ≤ 0.05), together with the expression of M2 markers such as the *Cd163*, *Arg1* and *Tlr8*

121 genes (Figure 2C, $p \le 0.05$), suggesting a decreased M2 macrophage polarization in these mice.

122 Expression of M1 markers (Csf2, Ifng) was not affected by IL-33 knockout, except Tnfa which was,

123 although significantly ($p \le 0.05$), moderately repressed.

124	The weight of the lesions was not correlated with the proportions of immune cells, except with the
125	proportion of CD206 ⁻ macrophages from IL-33 ^{-/-} mice ($p \le 0.05$), which increased with the weight of
126	lesions (Figure 2D). Surface expression of the IL-33 receptor, ST2, was detected for some of these
127	populations: T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ cells (T_{reg} lymphocytes), T CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ cells, CD206 ⁻ and CD206 ⁺
128	macrophages and dendritic cells (Figure 2E and 2F), but not T CD8 ⁺ , NK and NKT cells
129	(Supplementary Figure 2). A moderate expression of ST2 was also detected for B cells, neutrophils
130	and eosinophils (Supplementary Figure 2). Of note, for all cell populations, ST2 expression was not
131	significantly different between WT and IL-33 ^{-/-} mice.
132	Dosage of cytokines in peritoneal lavages, which are related to local immune events, showed higher
133	IL-10 concentrations in infected WT mice compared to uninfected (p ≤ 0.05) and infected IL-33 ^{-/-}
134	animals (p ≤ 0.05 , Figure 3). Concentrations of TGF- $\beta 1$ (p ≤ 0.01), TNF- α (p ≤ 0.01), IL-2 (p ≤ 0.01),
135	IL-9 (p ≤ 0.05) and CXCL1 (p ≤ 0.05) were significantly increased in infected WT, but not in infected
136	IL-33 ^{-/-} mice, conversely to CCL22, significantly increased in IL-33 ^{-/-} mice but not in WT mice (p
137	\leq 0.05). Compared to uninfected mice, other cytokines were either unchanged (IL-17A, IFN- γ),
138	equally increased in both WT and IL-33 ^{-/-} mice (IL-4, IL-5, IL-6) or not detected (IL-17F and IL-13)
139	Altogether, these data suggest that IL-33 is responsible for local macrophage polarization and mixed
140	Th1/Th2 cytokine profile, including secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10.
141	Endogenous IL-33 has little influence on hepatic immune response during peritoneal infection

- 142 Flow cytometry analysis of the liver-infiltrating cells showed an important recruitment of myeloid
- 143 cells upon peritoneal infection with *E. multilocularis* ($p \le 0.001$ and $p \le 0.05$ for WT and IL-33^{-/-} mice,
- 144 respectively), together with a decrease of NKT cell population ($p \le 0.01$ for both WT and IL-33^{-/-}
- 145 mice), compared to uninfected mice (Figure 4A). Proportions of other analyzed immune cell
- 146 populations were not altered by the adjacent (peritoneal) infection. The CD4⁺/CD8⁺ T cells ratio was
- 147 not modified by IL-33 knockout (Figure 4B). The myeloid infiltrate was mainly composed of

148 neutrophils and CD206⁻ macrophages, and distributions of myeloid populations were not different

149 between WT and IL-33^{-/-} mice (Figure 4C). A moderate but statistically significant repression of *Il4*

- 150 expression was observed in IL-33^{-/-} mice (m=0.45±0.45) compared to uninfected controls
- 151 (m=1 \pm 0.22, p \leq 0.05) (Figure 4D). Quantification of mRNA expression in the liver did not show
- 152 differences between WT and IL-33^{-/-} mice for other genes, including for Th1 (*Tnfa*, *Il12p35*, *Ifng*,
- 153 *Il1b*), Th2 (*Il6*, *Tgfb1*, *Il10*), Th17 (*Il17f*) and anti-inflammatory (*Il1rn*) mediators. The *Tgfb1* gene

154 was repressed in both WT and IL-33^{-/-} mice compared to uninfected controls ($p \le 0.05$).

155 Systemic response requires endogenous IL-33 to enhance metacestode growth

156 Overall, the mean serum concentrations of all detected cytokines (IFN-γ, IL-17A, IL-17F, IL-5, IL-4,

157 IL-6, IL-9, IL-1β, TNF-α) except IL-13, IL-12p40 and IL-23, significantly increased over time in

both groups of mice (Figure 5A and Supplementary Figure 3). Serum concentrations of IL-5 at 1

159 month p.i. (early stage) were higher in WT mice compared to IL-33^{-/-} mice ($p \le 0.05$, Figure 5A). At 2

160 months p.i. (intermediate stage), serum concentrations of IL-12p40 were higher in WT mice

161 compared to IL-33^{-/-} mice ($p \le 0.05$, Supplementary Figure 3). At a later stage, higher IL-17F

162 concentrations were observed in the sera of IL-33^{-/-} mice ($p \le 0.05$ at 4 months, compared to WT),

163 suggesting that IL-33 could be associated with a decreased Th17 response (Figure 5A). No

164 differences were observed between both groups for other cytokines. Comparison with cytokine

165 concentrations in peritoneal lavages showed that IL-17F and IL-13 were detected only in sera,

166 whereas IL-10 was detected only in peritoneal lavages (Figure 3).

167 Analysis of pairwise correlation coefficients at 4 months p.i. showed that in the WT group, the

- 168 weight of parasitic lesions was significantly and positively correlated with Th2 cytokines (Figure
- 169 5B), such as IL-4 (r=0.86, p \leq 0.001) and IL-5 (r=0.88, p \leq 0.001), but also the Th1 IFN- γ (r=0.81, p \leq 0.001)
- $170 \leq 0.01$). In this group, hierarchical classification showed a strong connection between the weight of

parasitic lesions, and IL-4, IL-5 and IFN- γ , which belonged to the same cluster. In IL-33^{-/-} mice, also 171 172 at 4 months p.i., the weight of lesions was not correlated with cytokines (Figure 5B). IL-4, IL-5, IL-173 17A, IL-12p40, IFN- γ , IL-1 β and TNF- α were linked by significant pairwise correlation coefficients 174 (p between ≤ 0.05 and ≤ 0.001 for each possible combination) and were grouped together by low 175 hierarchical clustering distances. On contrary to WT group, IL-17F was significantly correlated with TNF- α (p <0.05) and IFN- γ (p <0.05). Altogether, these results showed that IL-33^{-/-} mice had a more 176 177 efficient Th1/Th17 component at late stage than WT mice. The systemic Th2 component was similar in both groups, but was not associated with an accelerated parasite growth in IL-33^{-/-} mice, in contrast 178 179 to the WT group. This suggests that the mixed Th1/Th2 response observed in WT mice requires IL-180 33 to favor the metacestode growth.

181 IL-33 is expressed in the periparasitic liver tissue in human alveolar echinococcosis

182 To assess whether the local role of IL-33 in the mouse peritoneal infection model could be 183 extrapolated to human AE cases, we performed IL-33 quantification in protein extracts from 184 parasitic, periparasitic and liver parenchyma tissue biopsies from three patients infected with E. 185 *multilocularis* (Figure 6A). We showed that IL-33 concentration was higher in parasitic ($p \le 0.05$) and 186 periparasitic tissues (ns) compared to surrounding parenchyma (Figure 6B). Additionally, IL-33 and 187 the soluble form of ST2 (ST2s) were quantified in the sera of patients suffering from AE, before and 188 after radical surgery. As observed for mice, IL-33 was not detectable in sera, and ST2s was detected 189 but no significant differences were observed before and after surgery (Figure 6C). We also performed 190 immunofluorescence staining on liver biopsies of five patients infected with E. multilocularis (the 191 three previously mentioned patients and two additional ones, for whom a Formalin-Fixed Paraffin-192 Embedded (FFPE) biopsy was available). In all samples, we observed an important neovasculature in 193 the periparasitic granuloma, highlighted by the presence of numerous CD31⁺ endothelial cells (Figure 194 6D and Supplementary Figure 4). IL-33 was detected in the nuclei of endothelial cells (mainly in

periparasitic tissues) and some hepatocytes (only in close parenchyma), but the density of IL-33⁺
nuclei was similar between parenchyma and periparasitic granuloma (Figure 6E). IL-33-expressing

197 endothelial cells (CD31⁺) were mainly located among the lymphoid infiltrate, an area where $FoxP3^+$

- 198 T_{regs} were also highly prevalent (Figure 6E).
- 199

200 **DISCUSSION**

201 Alveolar echinococcosis is an atypical parasitic disease in the way that it shares more similarities 202 with cancer than with other helminthic infections: it presents as a slowly and perpetually growing 203 mass composed of parasitic vesicles, stromal and immune cells, neovasculature and extracellular 204 matrix, and has the potential of metastatic dissemination (23). Following this analogy, we 205 hypothesized that IL-33 favors AE, as it has been demonstrated in several tumor models that IL-33 is 206 associated with a pro-tumorigenic microenvironment, especially through accumulation of M2-like 207 $(CD206^{+})$ tumor-associated macrophages (TAMs) (24–26), but also through enhancement of T_{regs} 208 Th2 and ILC2s activity (27, 28). In our study, the lack of IL-33 led to a decrease of the parasitic 209 growth during peritoneal mouse AE. The level of Th2 cytokines in mouse serum was correlated with 210 the weight of the metacestodes in WT mice, in agreement with previous studies showing the role of these cytokines in parasite growth (5). However, such correlation was not observed in IL-33^{-/-} mice, 211 212 suggesting that systemic Th2 cytokines do not act directly on parasite growth but rather through one 213 or several indirect mechanisms that requires IL-33. Two of these could be the local activation of T_{ress} 214 and polarization of macrophages. Indeed, IL-33, which was not detected in serum, was present in the 215 periparasitic tissues of WT mice, where it was associated with an increase in M2-like macrophages 216 together with the concentrations of the immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF-β1, compared to IL-33^{-/-} mice. Additionally, we observed that proportion CD206⁻ macrophages in peritoneal fluid 217

218	was correlated with the weight of lesions in IL-33 ^{-/-} but not in WT mice, supporting that the lack of
219	IL-33 improved local response. In humans, IL-33 expression was increased in the parasitic tissue and
220	localized in the nuclei of hepatocytes and endothelial cells of neovessels. This suggests that IL-33
221	could be released in the periparasitic microenvironment during human AE and interact with
222	tolerogenic T_{regs} and macrophages, as observed in mouse.
223	CD206 ⁺ macrophages were described to promote angiogenesis and to produce chemokines
224	supporting tumor growth (29, 30). AE was shown to be associated with periparasitic accumulation of
225	monocyte-derived M1 macrophages during the early phase of infection, which acquire a M2
226	phenotype (CD206 ⁺) during the chronic stage of infection (31, 32). These macrophages are
227	considered to favor parasite growth, as they secrete the anti-inflammatory cytokine IL-10 and the
228	fibrogenic cytokine TGF- β 1, which has a dual role by slowing the parasite growth on one hand, and
229	having immunosuppressive properties on the other hand (32–34). Interestingly, we observed in IL-33 ⁻
230	^{/-} mice both a decrease of CD206 ⁺ tolerogenic macrophages and lower concentrations of IL-10 and
231	TGF- β 1 in the peritoneal cavity, compared to WT mice. We also observed a tendency to lower
232	concentrations of the Th1 cytokines TNF-a (together with repression of <i>Tnfa</i> mRNA expression), IL-
233	2 and Th1 chemokine CXCL-1, and to higher concentrations of the Th2 chemokine CCL22 in IL-33-/-
234	mice, which could seem contradictory with the decrease of M2 macrophages. However, it has been
235	shown in a mouse model of airway injury that ST2 stimulation during M2 macrophages polarization
236	induces Tnfa, Il2 and Cxcl1 expression, and represses Ccl22 expression, which strikingly correlates
237	with our observations (Supplementary data of (35)). Altogether, this suggests that, during AE,
238	endogenous IL-33 contributes to the local M2 polarization and to the mixed Th1/Th2 local cytokinic
239	profile.

240 IL-33 is also known to enhance stability and immunosuppressive activity of T_{regs} (36, 37). Using an *in vivo* mouse model of colonic inflammation, Schiering et al. showed that IL-33 acts locally, upon

- tissue damage, to stabilize T_{regs} through ST2 signaling (36). T_{regs} are major actors in AE
- 243 pathophysiology (9), especially due to their IL-10 and TGF-β1 production (8, 38), and it was shown
- that their depletion leads to smaller lesions (8). In our model, peritoneal T_{regs} highly expressed the IL-
- 245 33 receptor ST2, suggesting that they can respond to IL-33 released upon tissue damage by the
- parasite, as previously reported with other diseases (12, 25, 36). We did not observe increased
- 247 proportions of T_{regs} in WT mice compared to IL-33^{-/-} mice, but it was shown previously that

recruitment of $ST2^+ T_{regs}$ is independent of IL-33 signal, leading to similar or even higher proportions of T_{regs} in IL-33^{-/-} mice (39).

250 Altogether, our data suggest that IL-33 is involved in the tolerogenic microenvironment in the 251 periparasitic tissues in late-stage AE. Immunofluorescence data from human samples suggest that the main source of the alarmin are endothelial cells of the neovessels, but a role for the $IL-33^+$ 252 253 periparasitic hepatocytes cannot be excluded. It should be noted that a strong neoangiogenesis is 254 characteristic of AE and the metacestode modulates host response to favor it (40-42), leading to the accumulation of periparasitic CD31⁺IL-33⁺ endothelial cells (41, 43). As the parasite grows, it 255 256 induces damages to the neovessels, thus likely leading to the extracellular release of IL-33 that could 257 be further cleaved into shorter and more active forms by mast cells or neutrophils proteases (44, 45). Following its release, IL-33 activates locally recruited ST2⁺ cells, such as T_{reg} and non-T_{reg} CD4⁺ 258 259 cells (likely Th2 cells), and polarizes macrophages into M2 macrophages, which could increase Th2 260 and T_{reg} responses and repress Th1 and Th17 responses (Figure 7A). This microenvironment could 261 favor parasite growth, leading to vascular damages, which in turn would release more IL-33. This 262 vicious circle could be the target of new therapeutic strategies, combining albendazole medication 263 with IL-33-blocking antibodies currently in clinical trials for chronic inflammatory lung diseases 264 (46).

265 A limitation of our study is the model of secondary peritoneal infection. In the natural cycle, rodents 266 are infected with E. multilocularis by ingesting eggs, leading primarily to hepatic lesions. In this 267 work, we inoculated metacestodes directly in the peritoneum of mice, using a different infective stage 268 and leading to a different location of infection. However, this model, which is frequently used to 269 study AE pathophysiology (9, 47), avoids the first pathophysiological uncertainty, i.e. the passage of 270 the oncospheres through the intestinal mucosa, which conditions the establishment into the liver, thus 271 permits to focus on the immunological response against the metacestode itself (Figure 7B). Thanks to 272 this model, we showed that local IL-33 is needed for modulation of the immune response to favor 273 parasite growth. Additionally, the intraperitoneal AE model mimics advanced stages of AE, where 274 dissemination in the peritoneal cavity is common (48).

275

276 MATERIALS AND METHODS

277 Ethics statement

278 All experimental protocols on animals were conducted in compliance with French laws and the

279 institution's guidelines for animal welfare (authors were authorized to conduct animal

280 experimentation by "La direction des Services Vétérinaires", the project was authorized by the

281 "Comité Régional d'Ethique d'Expérimentation Animal" (CREAA), license given by the "Ministère

de l'Education Nationale et de la Recherche", #15809-2018062910294494 and #28586-

283 202011261535409). Human sera were collected from 6 AE patients managed at the Rennes

284 University Hospital (Rennes, France), with the approval of the local Ethics Committee (approval no

285 20.133), and from 12 AE patients managed at the Institute of Infectious Diseases of Bern

286 (Switzerland), with the approval of the Cantonal Ethics Committee (KEK) 382-15. Human liver

samples were collected from 5 AE patients managed at the Rennes University Hospital, with the

approval of the local Ethics Committee (approval no 20.133).

289 Animals and infection procedure

290

291 housed in individual cages, and bred in specific pathogen-free conditions in conventional animal 292 facility (Arche platform, Biosit, Rennes) with a 12 h dark-light cycle, under 25°C, 50% relative 293 humidity and HEPA-filtered air (Forma Scientific, Marietta, OH), with food and water ad libitum. IL-33^{-/-} mice were crossed with C57Bl/6J mice (Charles River Labs, Saint-Germain-Nuelles, France). 294 Heterozygous mice were crossed in order to obtain IL-33^{-/-} and WT littermate newborns. Mice were 295 296 8-10 week-old before peritoneal inoculation with 100 µL of metacestode suspension. Briefly, a 297 clinical isolate of E. multilocularis (H95) (50) was maintained in vivo by serial peritoneal infections 298 of BALB/c mice (Janvier Laboratories, Le Genest-Saint-Isle, France). Before experiments, 299 metacestodes were collected from an infected mouse, crushed and sieved to remove debris. After an 300 overnight sedimentation in PBS at 4°C, the pellet was washed with PBS and centrifuged 5 min 500 g 301 at 4°C. The pellet, which contained microvesicles and germinal cells, was suspended in PBS before peritoneal inoculation. Additionally, non-infected WT and IL-33^{-/-} littermates were grouped together 302 303 to constitute the "Uninfected" group, as they have similar phenotypes in absence of inflammation 304 (49, 51, 52). Submandibular blood samples were taken at different time points during the course of 305 infection. At 4 months post-infection (p.i.), mice were euthanized by cervical dislocation and blood, 306 peritoneal lavages with 10 mL of PBS, parasitic lesions and livers were collected.

The IL-33^{-/-} strain of C57Bl/6J mice was developed in Université de Toulouse (49). Animals were

307 Protein extraction

308 Total proteins were extracted from mouse and human tissues by lysis in RIPA buffer (50 mM Tris-

- 309 HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10.7 mM magnesium chloride, 0.2% sodium
- 310 deoxycholate, 0.2% sodium dodecyl sulfate, all reagents provided by Sigma Aldrich, Saint-Quentin-
- 311 Fallavier, France) supplemented with phosphatase inhibitor (PhosSTOP® EASYpack, Roche
- 312 Diagnostics, Meylan, France) and protease inhibitor (cOmplete® Mini, Roche Diagnostics, Meylan,

313 France) cocktails, and crushed using the TissueLyser LT device (Qiagen®, Les Ulis, France) at 50

Hz during 2 min. Supernatants were collected after centrifugation at 14.000 g for 15 min at 4°C and

315 sonicated. Before further use, protein concentration was determined by the Bradford method, using

316 the Bio-Rad® Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France).

317 IL-33 and ST2 dosage

Murine IL-33 was quantified in sera and periparasitic tissues of mice using the DuoSet® Mouse IL-319 33 assay (R&D SystemsTM, Bio-Techne®, Lille, France). Protein extracts from tissues were diluted 320 to 0.5 g/L of total protein before assay. Human IL-33 and ST2s were quantified in serum and/or liver 321 tissues using the Quantikine® Human IL-33 and Quantikine® Human ST2/IL-33R assays (R&D

322 SystemsTM, Bio-Techne®, Lille, France), following manufacturer's recommendations.

323 Flow cytometry

324 Flow cytometry was performed on peritoneal lavages and liver-infiltrating cells. Infiltrating cells 325 were isolated from livers as previously described (53). Briefly, livers were crushed on 70 µm cell 326 strainers and cells were sedimented during 1 h, and fractioned using a 35% Percoll® (Percoll density 327 gradient media, GE Healthcare, Life Sciences, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) gradient 328 centrifugation. Red blood cells were then lysed using Erythrocyte-lysing reagent Easylyse (Agilent 329 Technologies, Dako, Les Ulis, France). Two different panels of antibodies, one for lymphoid cells 330 and another for myeloid cells (panels 1 and 2, respectively, Supplementary Table 1), were used for staining. Cell suspensions were labeled for 30 min with LIVE/DEADTM fixable stain (InvitrogenTM, 331 332 Thermo Fisher Scientific®, Illkirch, France), with panel 1, or Zombie NIR Fixable Viability Kit 333 (Biolegend®, Paris, France), with panel 2, to exclude dead cells. The FcR Blocking reagent (Purified 334 NA/LE rat anti-mouse CD16/CD32, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) was used with both panels to avoid unspecific staining. Acquisition was performed with the LSR X-20 FortessaTM flow 335 336 cytometer (Becton Dickinson, Plateform CytomeTRI, SFR Biosit-UMS CNRS 3480-INSERM 018,

337 Rennes, France) and data were analyzed with the FlowlogicTM v7.3 software (Inivai Technologies,

338 Mentone Victoria, Australia). The used gating strategy is detailed in Supplementary Figure 1.

339 Proportions of immune cell populations were determined by reporting the number of events out of

the sum of all populations events.

341 RNA extraction and cDNA synthesis

342 Approximately 30 mg of tissues, either of liver samples or periparasitic tissues (parasitic membranes

343 and host conjunctive tissues), were homogenized using the TissueLyser LT device (Qiagen®, Les

344 Ulis, France) at 50 Hz during 2 min. Total RNAs were then extracted using the NucleoSpin® RNA

345 kit (Macherey-Nagel®, Hoerdt, France), following manufacturer's recommendations.

346 Complementary DNAs (cDNAs) were synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse

347 Transcription kit (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific®, Illkirch, France) and 2 µg of

total RNA extract per sample. The obtained cDNAs were then diluted at 1:3 before amplification.

349 mRNA expression quantification

350 Quantification of mRNA expression was performed by qPCR using the CFX Opus 384 real-time 351 PCR system (Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France). Each reaction was done in a 10 µL total 352 volume, with the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Thermo Fisher 353 Scientific®, Illkirch, France), 0.6 µM of each primer and 2 µL of diluted cDNA. The used primers 354 are detailed in Supplementary Table 2 (52, 54–57). After an initial denaturation of 10 min at 95°C, 40 355 cycles of 95°C during 15 sec then 60°C during 1 min were applied, and finished with a melt curve from 60°C to 95°C. Results were expressed as fold-change expression of IL-33^{-/-} mice compared to 356 WT mice, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Mouse housekeeping genes were *actb* and *gapdh* for liver 357 358 samples, gapdh and ppid for periparasitic tissues, and parasite housekeeping gene was actII.

359 Multiplex cytokine dosage

16

360 Multiplex cytokine dosage in sera and peritoneal lavages of mice was performed by flow cytometry, 361 using the Legendplex assays (BioLegend, Paris, France). Two kits with pre-mixed beads were used, 362 the 13-plex Mouse macrophage/microglia panel (BioLegend, Paris, France) and the 12-plex Mouse 363 Th cytokine panel (BioLegend, Paris, France), following manufacturer's recommendations. Prior to 364 multiplex dosage, 3.5 mL of peritoneal lavage was centrifuged 40 min at 3,000 g using Amicon® 365 Ultra-15 10K centrifugal filter devices (Merck Millipore, Molsheim, France) for concentration of cytokines. Acquisition was done with the LSR X-20 FortessaTM flow cytometer (Becton Dickinson, 366 367 Plateform CytomeTRI, SFR Biosit–UMS CNRS 3480-INSERM 018, Rennes, France).

368 Immunofluorescence staining

369 All reagents and devices were provided by Ventana Medical Systems (Tucson, AZ, USA), except if 370 stated otherwise. Paraffin-embedded tissue was cut at 4 µm, mounted on slides and dried at 58°C for 371 12 h. Two consecutive cuts were processed: one was stained with hematoxylin and eosin (HE), and 372 immunofluorescent staining was performed on the other using the DISCOVERY ULTRA stainer. 373 Following deparaffination with Ventana DISCOVERY Wash solution at 75 °C for 8 min, antigen 374 retrieval was performed by using Tris-based buffer solution CC1 at 95°C to 100°C for 40 min. 375 Endogen peroxidase was blocked with Disc inhibitor for 12 min at 37°C. After rinsing with reaction 376 buffer, slides were incubated at 37°C for 60 min with a 1:100 dilution of mouse anti-IL-33 (clone 377 Nessy-1) primary antibody (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France). After rinsing, signal 378 enhancement was performed using secondary antibody (anti-mouse-HRP) incubated for 16 min and 379 the DISCOVERY Rhodamine kit incubated 20 min. Following denaturation with Ventana solution 380 CC2 at 100°C for 8 min, and Disc inhibitor for 8 min at 37°C, slides were incubated at 37°C for 60 381 min with a 1:100 dilution of mouse anti-CD31 (clone JC70A) primary antibody (Dako, Agilent 382 Technologies, Santa Clara, CA, USA). After rinsing, signal enhancement was performed using 383 secondary antibody (anti-mouse-HRP) incubated for 16 min and the DISCOVERY DCC kit

17
384 incubated 20 min. Following denaturation with Ventana solution CC2 at 100°C for 8 min, and Disc 385 inhibitor for 8 min at 37°C, slides were incubated at 37°C for 60 min with a 1:100 dilution of rabbit 386 anti-FoxP3 (clone SP97) primary antibody (Abcam, Paris, France). After rinsing, signal enhancement was performed using secondary antibody (anti-rabbit-HRP) incubated for 16 min and the OpalTM 387 388 Polaris 780 Reagent Pack (Akoya Biosciences, Marlborough, MA, USA) incubated 20 min. Slides 389 were then counterstained for 4 min with DAPI and rinsed. After removal from the instrument, slides 390 were manually rinsed, coverslipped, and digitized using the Pannoramic Confocal device 391 (3DHISTECH, Budapest, Hungary). Digital slides were then read with the CaseViewer v2.4 software 392 (3DHISTECH, Budapest, Hungary). Quantification of immunofluorescence staining was done using QuPath v0.3.2 (58). IL- 33^+ nuclei and FoxP 3^+ cells were counted using an automated cell detection 393 tool, and proportion of CD31⁺ area was quantified using pixel classifier. 394

395 Statistical analyses

396 Data were analyzed with the GraphPad Prism v8.0.2 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). All 397 tests were two-tailed and a 5% α risk was applied. Statistical significance was noted using the same code throughout the manuscript: ns not significant, * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$. Difference 398 399 between experimental groups were assessed using the Mann-Whitney U test (comparison between 2 400 groups), or the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison *post-hoc* analysis (comparison 401 between more than 2 groups). Evolution of mice weight over time was assessed using a two-way 402 ANOVA for repeated measures with Bonferroni's posttests. Concentrations of cytokines in mice sera 403 were compared i) within groups, to the baseline start (day 0), using the Kruskal-Wallis test with 404 Dunn's multiple comparison *post-hoc* analysis, ii) between groups, using the Mann-Whitney U test. 405 Slopes of the linear regression between the weight of the lesions and the log-transformed proportions 406 of immune cells was tested using the F test. Pairwise correlation coefficients were calculated using 407 the R software v4.0.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), after normalization

408	of data by logarithmic transformation, and plotted as heatmaps using the heatmaply package (59).
409	Concentrations of IL-33 in human tissues were compared using the Friedman test with Dunn's
410	multiple comparison post-hoc analysis. Before- and after-surgery dosages of ST2 in human sera were
411	compared using paired t test. Immunofluorescence data were compared using the Mann-Whitney U
412	test. If not stated otherwise, mouse infection data originated from combination of two independent
413	experiments. All data and statistical tests results are provided in Supplementary data.
414	ACKNOWLEDGMENTS
415	The authors thank the whole Irset Team 2, especially Jacques Le Seyec and Claire Piquet-Pellorce for
416	their contribution. We thank the SFR Biosit UMS CNRS 3480-INSERM 018, Rennes
417	(https://biosit.univ-rennes1.fr/) H2P2 platform, especially Pascale Bellaud, for their technical
418	assistance for immunofluorescent stainings, CytomeTRI platform and the Arche animal house
419	platform.
420	Contribution of Britta Lundstroem-Stadelmann was supported by the SNSF project 310030_192072
421	fund.
422	B.A. Methodology, resources, investigation, data curation, formal analysis, validation, writing -
423	original draft, visualization. C.M. Investigation, data curation, formal analysis. B.LS.
424	Conceptualization, resources, writing – review & editing. JP.Gi. Resources, writing – review &
425	editing. B.G. Conceptualization, writing – review & editing. JP.Ga. Resources, funding acquisition.
426	M.S. Resources, funding acquisition, project administration. F.RG. & S.D. Conceptualization,
427	methodology, investigation, supervision, project administration, writing - review & editing. All
428	authors reviewed and agreed with the submitted version of the manuscript.
429	Authors have no conflict of interest to declare.
430	

REFERENCES

432	1.	Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, Torgerson PR, Harandi MF, Romig T, Antolova D,
433		Schurer JM, Lahmar S, Cringoli G, Magambo J, Thompson RCA, Jenkins EJ. 2017. Global
434		distribution of alveolar and cystic echinococcosis. Adv Parasitol 95:315-493.
435	2.	Vuitton DA, McManus DP, Rogan MT, Romig T, Gottstein B, Naidich A, Tuxun T, Wen H,
436		Silva AM da, Vuitton DA, McManus DP, Romig T, Rogan MR, Gottstein B, Silva AM da, Wen
437		H, Naidich A, Tuxun T, Avcioglu A, Boufana B, Budke C, Casulli A, Güven E, Hillenbrand A,
438		Jalousian F, Jemli MH, Knapp J, Laatamna A, Lahmar S, Naidich A, Rogan MT, Sadjjadi SM,
439		Schmidberger J, Amri M, Bellanger A-P, Benazzouz S, Brehm K, Hillenbrand A, Jalousian F,
440		Kachani M, Labsi M, Masala G, Silva AM da, Seyed MS, Soufli I, Touil-Boukoffa C, Wang J,
441		Zeyhle E, Aji T, Akhan O, Bresson-Hadni S, Dziri C, Gräter T, Grüner B, Haïf A, Hillenbrand
442		A, Koch S, Rogan MT, Tamarozzi F, Tuxun T, Giraudoux P, Torgerson P, Vizcaychipi K, Xiao
443		N, Altintas N, Lin R, Millon L, Zhang W, Achour K, Fan H, Junghanss T, Mantion GA. 2020.
444		International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. Parasite
445		27:41.
446	3.	Kern P, Wen H, Sato N, Vuitton DA, Gruener B, Shao Y, Delabrousse E, Kratzer W, Bresson-
447		Hadni S. 2006. WHO classification of alveolar echinococcosis: principles and application.
448		Parasitol Int 55 Suppl:S283-287.
449	4.	Wen H, Vuitton L, Tuxun T, Li J, Vuitton DA, Zhang W, McManus DP. 2019. Echinococcosis:
450		Advances in the 21st Century. Clin Microbiol Rev 32:e00075-18.
451	5.	Vuitton DA, Zhang SL, Yang Y, Godot V, Beurton I, Mantion G, Bresson-Hadni S. 2006.
452		Survival strategy of <i>Echinococcus multilocularis</i> in the human host. Parasitol Int 55:S51–S55.

453	6.	Nian X, Li L, Ma X, Li X, Li W, Zhang N, Ohiolei JA, Li L, Dai G, Liu Y, Yan H, Fu B, Xiao
454		S, Jia W. 2022. Understanding pathogen-host interplay by expression profiles of lncRNA and
455		mRNA in the liver of Echinococcus multilocularis-infected mice. PLoS Negl Trop Dis
456		16:e0010435.

- 457 7. Gottstein B, Wang J, Boubaker G, Marinova I, Spiliotis M, Müller N, Hemphill A. 2015.
 458 Susceptibility versus resistance in alveolar echinococcosis (larval infection with *Echinococcus*459 *multilocularis*). Vet Parasitol 213:103–109.
- 460 8. Wang J, Müller S, Lin R, Siffert M, Vuitton DA, Wen H, Gottstein B. 2017. Depletion of
- 461 FoxP3+ Tregs improves control of larval *Echinococcus multilocularis* infection by promoting
- 462 co-stimulation and Th1/17 immunity. Immun Inflamm Dis 5:435–447.
- 463 9. Wang J, Gottstein B. 2016. Immunoregulation in larval *Echinococcus multilocularis* infection.
 464 Parasite Immunol 38:182–192.
- 465 10. Cayrol C, Girard J-P. 2018. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family.
 466 Immunol Rev 281:154–168.
- 467 11. Cayrol C, Girard J-P. 2014. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity,
 468 inflammation and allergy. Curr Opin Immunol 31:31–37.
- 469 12. Faustino LD, Griffith JW, Rahimi RA, Nepal K, Hamilos DL, Cho JL, Medoff BD, Moon JJ,
- 470 Vignali DAA, Luster AD. 2020. Interleukin-33 activates regulatory T cells to suppress innate γδ
- 471 T cell responses in the lung. Nat Immunol 21:1371–1383.
- 472 13. Xu H, Li D, Ma J, Zhao Y, Xu L, Tian R, Liu Y, Sun L, Su J. 2021. The IL-33/ST2 axis affects
- 473 tumor growth by regulating mitophagy in macrophages and reprogramming their polarization.
- 474 Cancer Biol Med 18:172–183.

475	14.	Taniguchi S, Elhance A, Van Duzer A, Kumar S, Leitenberger JJ, Oshimori N. 2020. Tumor-
476		initiating cells establish an IL-33-TGF- β niche signaling loop to promote cancer progression.
477		Science 369:eaay1813.
478	15.	Di Salvo E, Ventura-Spagnolo E, Casciaro M, Navarra M, Gangemi S. 2018. IL-33/IL-31 Axis:
479		A Potential Inflammatory Pathway. Mediators Inflamm 2018:3858032.
480	16.	Peng H, Sun R, Zhang Q, Zhao J, Wei J, Zeng X, Zheng H, Wu Z. 2013. Interleukin 33
481		mediates type 2 immunity and inflammation in the central nervous system of mice infected with
482		Angiostrongylus cantonensis. J Infect Dis 207:860-869.
483	17.	Li Z-Y, Xiao L, Lin G, Tang J, Chen Y, Chen L, Li B, Wu M, Liu S, Huang C, Ferrandon D, Li
484		Z. 2019. Contribution of tissue transglutaminase to the severity of hepatic fibrosis resulting
485		from Schistosoma japonicum infection through the regulation of IL-33/ST2 expression. Parasit
486		Vectors 12:302.
487	18.	Lamberet A, Rostan O, Dion S, Jan A, Guegan H, Manuel C, Samson M, Gangneux J-P,
488		Robert-Gangneux F. 2020. IL-33/ST2 axis is involved in disease progression in the spleen
489		during Leishmania donovani infection. Parasit Vectors 13:320.
490	19.	Rostan O, Gangneux J-P, Piquet-Pellorce C, Manuel C, McKenzie ANJ, Guiguen C, Samson M,
491		Robert-Gangneux F. 2013. The IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis
492		and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with Leishmania donovani.
493		mBio 4:e00383-00313.
494	20.	Still KM, Batista SJ, O'Brien CA, Oyesola OO, Früh SP, Webb LM, Smirnov I, Kovacs MA,

495 Cowan MN, Hayes NW, Thompson JA, Tait Wojno ED, Harris TH. 2020. Astrocytes promote a

496		protective immune response to brain Toxoplasma gondii infection via IL-33-ST2 signaling.
497		PLoS Pathog 16:e1009027.
498	21.	Reverchon F, Mortaud S, Sivoyon M, Maillet I, Laugeray A, Palomo J, Montécot C, Herzine A,
499		Meme S, Meme W, Erard F, Ryffel B, Menuet A, Quesniaux VFJ. 2017. IL-33 receptor ST2
500		regulates the cognitive impairments associated with experimental cerebral malaria. PLoS Pathog
501		13:e1006322.
502	22.	Rostan O, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Robert-Gangneux F, Gangneux J-P, Samson M. 2015.
503		Crucial and diverse role of the interleukin-33/ST2 axis in infectious diseases. Infect Immun
504		83:1738–1748.
505	23.	Anderson NM, Simon MC. 2020. The tumor microenvironment. Curr Biol 30:R921–R925.
506	24.	Eissmann MF, Dijkstra C, Jarnicki A, Phesse T, Brunnberg J, Poh AR, Etemadi N, Tsantikos E,
507		Thiem S, Huntington ND, Hibbs ML, Boussioutas A, Grimbaldeston MA, Buchert M,
508		O'Donoghue RJJ, Masson F, Ernst M. 2019. IL-33-mediated mast cell activation promotes
509		gastric cancer through macrophage mobilization. Nat Commun 10:2735.
510	25.	De Boeck A, Ahn BY, D'Mello C, Lun X, Menon SV, Alshehri MM, Szulzewsky F, Shen Y,
511		Khan L, Dang NH, Reichardt E, Goring K-A, King J, Grisdale CJ, Grinshtein N,
512		Hambardzumyan D, Reilly KM, Blough MD, Cairneross JG, Yong VW, Marra MA, Jones SJM,
513		Kaplan DR, McCoy KD, Holland EC, Bose P, Chan JA, Robbins SM, Senger DL. 2020.
514		Glioma-derived IL-33 orchestrates an inflammatory brain tumor microenvironment that
515		accelerates glioma progression. Nat Commun 11:4997.
516	26.	Yang M, McKay D, Pollard JW, Lewis CE. 2018. Diverse functions of macrophages in different

517 tumor microenvironments. Cancer Res 78:5492–5503.

518	27.	Ameri AH, Moradi Tuchayi S, Zaalberg A, Park JH, Ngo KH, Li T, Lopez E, Colonna M, Lee
519		RT, Mino-Kenudson M, Demehri S. 2019. IL-33/regulatory T cell axis triggers the development
520		of a tumor-promoting immune environment in chronic inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A
521		116:2646–2651.
522	28.	Ercolano G, Gomez-Cadena A, Dumauthioz N, Vanoni G, Kreutzfeldt M, Wyss T, Michalik L,
523		Loyon R, Ianaro A, Ho P-C, Borg C, Kopf M, Merkler D, Krebs P, Romero P, Trabanelli S,
524		Jandus C. 2021. PPARy drives IL-33-dependent ILC2 pro-tumoral functions. Nat Commun
525		12:2538.
50(20	
526	29.	Enninga EAL, Chatzopoulos K, Butterfield J1, Sutor SL, Leontovich AA, Nevala WK, Flotte
527		TJ, Markovic SN. 2018. CD206-positive myeloid cells bind galectin-9 and promote a tumor-
528		supportive microenvironment. J Pathol 245:468-477.

530 Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. Oncoimmunology 8:1596004. 531

30. Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. 2019.

Wang H, Zhang C-S, Fang B-B, Hou J, Li W-D, Li Z-D, Li L, Bi X-J, Li L, Abulizi A, Shao Y-532 31.

M, Lin R-Y, Wen H. 2020. Dual role of hepatic macrophages in the establishment of the 533

Echinococcus multilocularis metacestode in mice. Front Immunol 11:600635. 534

535	32.	Chong S, Chen G, Dang Z, Niu F, Zhang L, Ma H, Zhao Y. 2022. Echinococcus multilocularis
536		drives the polarization of macrophages by regulating the RhoA-MAPK signaling pathway and
537		thus affects liver fibrosis. Bioengineered 13:8747-8758.

538	33.	Wang J, Zhang C	, Wei X, Blagosklonov	O, Lv G, I	Lu X, Mantion G	, Vuitton DA,	Wen H, Lin
-----	-----	-----------------	-----------------------	------------	-----------------	---------------	------------

R. 2013. TGF-β and TGF-β/Smad signaling in the Interactions between *Echinococcus multilocularis* and its hosts. PLoS One 8:e55379.

541 34. Chen J, Gingold JA, Su X. 2019. Immunomodulatory TGF-β signaling in hepatocellular
542 carcinoma. Trends Mol Med 25:1010–1023.

543 35. Dagher R, Copenhaver AM, Besnard V, Berlin A, Hamidi F, Maret M, Wang J, Qu X, Shrestha

544 Y, Wu J, Gautier G, Raja R, Aubier M, Kolbeck R, Humbles AA, Pretolani M. 2020. IL-33-ST2

545 axis regulates myeloid cell differentiation and activation enabling effective club cell

546 regeneration. Nat Commun 11:4786.

547 36. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelmann K, Wohlfert EA, Pott J, Griseri

548 T, Bollrath J, Hegazy AN, Harrison OJ, Owens BMJ, Löhning M, Belkaid Y, Fallon PG, Powrie

549 F. 2014. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. Nature
550 513:564–568.

551 37. Pastille E, Wasmer M-H, Adamczyk A, Vu VP, Mager LF, Phuong NNT, Palmieri V, Simillion

552 C, Hansen W, Kasper S, Schuler M, Muggli B, McCoy KD, Buer J, Zlobec I, Westendorf AM,

553 Krebs P. 2019. The IL-33/ST2 pathway shapes the regulatory T cell phenotype to promote

intestinal cancer. 4. Mucosal Immunol 12:990–1003.

38. Mejri N, Müller N, Hemphill A, Gottstein B. 2011. Intraperitoneal *Echinococcus multilocularis*infection in mice modulates peritoneal CD4+ and CD8+ regulatory T cell development.
Parasitol Int 60:45–53.

558	39.	Siede J, Fröhlich A, Datsi A, Hegazy AN, Varga DV, Holecska V, Saito H, Nakae S, Löhning
559		M. 2016. IL-33 Receptor-Expressing Regulatory T Cells Are Highly Activated, Th2 Biased and
560		Suppress CD4 T Cell Proliferation through IL-10 and TGF β Release. PLoS One 11:e0161507.
561	40.	Guerret S, Vuitton DA, Liance M, Pater C, Carbillet JP. 1998. Echinococcus multilocularis:
562		relationship between susceptibility/resistance and liver fibrogenesis in experimental mice.
563		Parasitol Res 84:657–667.
564	41.	Boubaker G, Strempel S, Hemphill A, Müller N, Wang J, Gottstein B, Spiliotis M. 2020.
565		Regulation of hepatic microRNAs in response to early stage Echinococcus multilocularis egg
566		infection in C57BL/6 mice. PLoS Negl Trop Dis 14:e0007640.
567	42.	Stadelmann B, Spiliotis M, Müller J, Scholl S, Müller N, Gottstein B, Hemphill A. 2010.
568		Echinococcus multilocularis phosphoglucose isomerase (EmPGI): a glycolytic enzyme involved
569		in metacestode growth and parasite-host cell interactions. Int J Parasitol 40:1563–1574.
570	43.	Cheng Z, Liu F, Li X, Dai M, Wu J, Guo X, Tian H, Heng Z, Lu Y, Chai X, Wang Y. 2017.
571		EGF-mediated EGFR/ERK signaling pathway promotes germinative cell proliferation in
572		Echinococcus multilocularis that contributes to larval growth and development. PLoS Negl
573		Trop Dis 11:e0005418.
574	44.	Lefrançais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard J-P, Cayrol C.
575		2012. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G.
576		Proc Natl Acad Sci U S A 109:1673–1678.
577	45.	Lefrançais E, Duval A, Mirey E, Roga S, Espinosa E, Cayrol C, Girard J-P. 2014. Central
578		domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate
579		lymphoid cells. Proc Natl Acad Sci U S A 111:15502–15507.

580	46.	Wechsler ME, Ruddy MK, Pavord ID, Israel E, Rabe KF, Ford LB, Maspero JF, Abdulai RM,
581		Hu C-C, Martincova R, Jessel A, Nivens MC, Amin N, Weinreich DM, Yancopoulos GD,
582		Goulaouic H. 2021. Efficacy and Safety of Itepekimab in Patients with Moderate-to-Severe
583		Asthma. N Engl J Med 385:1656–1668.
584	47.	Vuitton DA, Gottstein B. 2010. Echinococcus multilocularis and its intermediate host: a model
585		of parasite-host interplay. J Biomed Biotechnol 2010:923193.
586	48.	Czermak BV, Unsinn KM, Gotwald T, Waldenberger P, Freund MC, Bale RJ, Vogel W,
587		Jaschke WR. 2001. Echinococcus multilocularis revisited. AJR Am J Roentgenol 176:1207-
588		1212.
589	<u>4</u> 9	Pichery M Mirey E Mercier P Lefrançais E Dujardin A Ortega N Girard I-P 2012
507	77.	Thenery W, Wheey E, Wereler T, Demaneurs E, Dujardin A, Ortega W, Onard J T. 2012.
590		Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs,
591		brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel II-33-LacZ gene trap

reporter strain. J Immunol 188:3488–3495.

593 50. Rufener R, Dick L, D'Ascoli L, Ritler D, Hizem A, Wells TNC, Hemphill A, Lundström-

594 Stadelmann B. 2018. Repurposing of an old drug: In vitro and in vivo efficacies of

595 buparvaquone against *Echinococcus multilocularis*. International Journal for Parasitology:

596 Drugs and Drug Resistance 8:440–450.

597 51. Carrière V, Arshad MI, Le Seyec J, Lefevre B, Farooq M, Jan A, Manuel C, Touami-Bernard L,

598 Lucas-Clerc C, Genet V, Gascan H, Girard J-P, Chalmel F, Lamontagne L, Piquet-Pellorce C,

- 599 Samson M. 2017. Endogenous IL-33 Deficiency Exacerbates Liver Injury and Increases Hepatic
- 600 Influx of Neutrophils in Acute Murine Viral Hepatitis. Mediators Inflamm 2017:1359064.

601	52.	Vasseur P, Dion S, Filliol A, Genet V, Lucas-Clerc C, Jean-Philippe G, Silvain C, Lecron J-C,
602		Piquet-Pellorce C, Samson M. 2017. Endogenous IL-33 has no effect on the progression of
603		fibrosis during experimental steatohepatitis. Oncotarget 8:48563-48574.
604	53.	Simoes Eugénio M, Farooq M, Dion S, Devisme C, Raguenes-Nicol C, Piquet-Pellorce C,
605		Samson M, Dimanche-Boitrel M-T, Le Seyec J. 2020. Hepatocellular carcinoma emergence in
606		diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis depends on diet and is delayed in liver
607		exhibiting an active immune response. Cancers (Basel) 12:1491.
608	54.	Wang X, Spandidos A, Wang H, Seed B. 2012. PrimerBank: a PCR primer database for
609		quantitative gene expression analysis, 2012 update. Nucleic Acids Res 40:D1144-1149.
610	55.	Filliol A, Piquet-Pellorce C, Raguénès-Nicol C, Dion S, Farooq M, Lucas-Clerc C,
611		Vandenabeele P, Bertrand MJM, Le Seyec J, Samson M. 2017. RIPK1 protects hepatocytes
612		from Kupffer cells-mediated TNF-induced apoptosis in mouse models of PAMP-induced
613		hepatitis. J Hepatol 66:1205–1213.
614	56.	Boubaker G, Hemphill A, Huber CO, Spiliotis M, Babba H, Gottstein B. 2015. Prevention and
615		immunotherapy of secondary murine alveolar echinococcosis employing recombinant EmP29
616		antigen. PLoS Negl Trop Dis 9:e0003795.
617	57.	Matsumoto J, Müller N, Hemphill A, Oku Y, Kamiya M, Gottstein B. 2006. 14-3-3- and II/3-
618		10-gene expression as molecular markers to address viability and growth activity of
619		Echinococcus multilocularis metacestodes. Parasitology 132:83-94.
620	58.	Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S,
621		Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. 2017. QuPath:
622		Open source software for digital pathology image analysis. Sci Rep 7:16878.

623 59. Galili T, O'Callaghan A, Sidi J, Sievert C. 2018. heatmaply: an R package for creating
624 interactive cluster heatmaps for online publishing. Bioinformatics 34:1600–1602.

625

626 FIGURES CAPTIONS

627 Figure 1. Endogenous IL-33 is associated with accelerated course of alveolar echinococcosis.

- 628 (A) Wet weight of peritoneal metacestodes collected from mice after 4 months of infection. (B)
- 629 Mouse weight evolution during the course of infection. (C) Quantification of the *Em14-3-3* gene
- 630 expression, a parasite viability marker, normalized using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and *E. multilocularis ActII*
- 631 gene. (D) Representative pictures of peritoneal lesions (surrounded by dotted lines) from WT and IL-
- 632 33^{-/-} mice. Figure 1A and 1B: pooled data from 2 independent experiments, with 12 WT and 14 IL-
- 633 33^{-/-} mice. Figure 1C: data obtained from one experiment, with 6 WT and 5 IL-33^{-/-} mice. Plots show
- 634 mean \pm SD. Significance was tested using Mann-Whitney U test (Figure 1A and 1C) and two-way
- 635 ANOVA for repeated measures with Bonferroni's posttests (Figure 1B). * p≤0.05, ** p≤0.01, ***
- 636 p≤0.001.

637 Figure 2. Endogenous IL-33 modulates peritoneal cell populations during AE.

638 (A) Composition of peritoneal cell infiltrates at 4 months post infection. (B) Proportion of CD206⁺

639 monocytes/macrophages in peritoneal infiltrates. (C) Quantification of gene expression in the

- 640 periparasitic tissues, normalized using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and the *Gapdh* and *Ppid* endogenous controls.
- 641 (D) Linear regression between the weight of lesions and proportions of peritoneal cell populations of
- 642 WT (blue dots and line) and IL-33^{-/-} mice (orange dots and line). (E) Representative histograms of
- 643 ST2 expression by peritoneal cell populations of WT (blue line) and IL-33^{-/-} mice (orange line), and
- 644 their respective Fluorescence Minus One (FMO) controls (grey line). (F) For each population,

- 645 Median Fluorescence Intensities (MFI) were plotted in a graph below histogram. Figure 2A, 2B and
- 646 2D: pooled data from 2 independent experiments, with 5 uninfected, 11 WT and 14 IL-33^{-/-} mice.
- 647 Figure 2C and 2F: data obtained from one experiment, with 6 WT and 5 IL-33^{-/-} mice. Plots show
- 648 mean \pm SD (Figure 2A, 2B, 2C, 2F) and the r² correlation coefficient (Figure 2D). Significance was
- 649 tested using the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison post-hoc analysis (Figure 2A
- and 2F), the Mann-Whitney U test (Figure 2B and 2C) and the F test (Figure 2D). * $p \le 0.05$, **
- 651 p≤0.01, *** p≤0.001.

Figure 3. Endogenous IL-33 modulates concentrations of cytokines in peritoneal lavages during AE.

654 Cytokine concentrations determined by flow cytometry in peritoneal lavages of WT and IL-33^{-/-} at 4

655 months post infection. Data obtained from one experiment, with 5 uninfected, 6 WT and 6 IL-33^{-/-}

- 656 mice. Plots show mean \pm SD. Significance was tested using the Kruskal-Wallis test with Dunn's
- 657 multiple comparison *post-hoc* analysis. * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$.

Figure 4. Endogenous IL-33 has little impact on cellular and transcription profiles in the liver.

659 (A) Composition of liver cellular infiltrates at 4 months post infection. The gating strategy was the

same than for peritoneal cells, except that Panel 2 was applied in 1 on 2 experiments. (B) Ratio of

- 661 CD4⁺/CD8⁺ T cells. (C) Myeloid subpopulations of liver cellular infiltrates. (D) Quantification of
- 662 gene expression in the liver, normalized using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and the *Gapdh* and *Actb* endogenous
- 663 controls. Figure 4A, 4B, 4D: Pooled data from 2 independent experiments, with 5 uninfected, 11 WT
- and 14 IL-33^{-/-} mice. Fig 4C: Data obtained from one experiment, with 5 mice in each group. Plots
- show mean \pm SD. Significance was tested using the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple
- 666 comparison *post-hoc* analysis. * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$.

667 Figure 5. Endogenous IL-33 modulates systemic cytokine profiles during AE.

(A) Cytokines concentrations determined by flow cytometry in the serum of WT and IL-33^{-/-} mice 668 669 during the course of infection. Blue and orange symbols depict statistical significance over time 670 within each group of mice (Kruskal-Wallis with post-hoc Dunn's Multiple Comparison test), and 671 black symbols stand for comparison between mice groups at a given time point (Mann-Whitney U 672 test). Concentrations were normalized by logarithmic transformation. Dotted lines depict 95% 673 Confidence Intervals. (B) Heatmaps of pairwise correlation coefficients analysis between serum 674 cytokines concentrations at 4 months post infection. Color and size of dots depict value of correlation 675 coefficients and their statistical significance, respectively. Pooled data from 2 independent experiments, with 10 WT and 14 IL-33^{-/-} mice. The parameter "Lesion" stands for the weight of the 676 metacestodes 4 months post infection. * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$. 677

678 Figure 6. IL-33 is detected in liver alveolar echinococcosis lesions from human patients.

679 (A) Anatomic areas sampled for IL-33 quantification in the liver of patients with AE (n=3). Squares 680 show the location of biopsy samples. (B) IL-33 concentrations according to the site of sample. 681 Quantification after tissue lysis and ELISA dosage. Friedman test and *post-hoc* Dunn's Multiple 682 Comparison Test (* $p \le 0.05$). (C) Concentrations of soluble ST2 in sera of 18 patients infected with 683 E. multilocularis, before and after curative surgery. Significance was tested using Wilcoxon matched-684 pairs signed rank test. (D) Annotated hematoxylin and eosin staining, immunofluorescence staining 685 of consecutive histological sections, using DAPI, anti-IL-33, anti-CD31, and anti-FoxP3 antibodies, 686 and higher magnifications of structures of interest. Representative picture of biopsy slides obtained from 5 patients. (E) Quantification of density of IL-33⁺ nuclei (up), density of FoxP3⁺ cells (middle) 687 and proportion of CD31⁺ area (down), in liver parenchyma and periparasitic granuloma, from 688 689 immunofluorescence staining of human biopsy slides (n=5). Mann-Whitney U test (** $p \le 0.01$).

- Figure 7. Model of the modulation of the host immune response by IL-33 and its impact onparasite growth.
- 692 (A) A schematic presentation of the IL-33 putative mechanism of action during alveolar 693 echinococcosis (AE). O IL-33 is released from neovasculature upon tissue damage by parasite growth, \odot it locally activates ST2⁺ leukocytes, such as Th2_{RM}, ILC2s and T_{regs}, and contributes to 694 695 polarization of macrophages into "M2" phenotype, ③ ST2⁺ leukocytes favor parasite growth by 696 orientating immunity toward a tolerogenic phenotype. Blockade of IL-33 in a therapeutic purpose 697 could limit the progression of the disease. (B) Schematic modeling of AE pathophysiology. After 698 contamination with E. multilocularis eggs, the parasite has to pass through 3 immunological events 699 (framed text) to develop as a viable metacestode. Once done, immunological factors only impact the 700 growth rate of the parasite, with Th1/Th17 and Th2/T_{reg} responses decreasing and increasing it, 701 respectively. We showed that the alarmin IL-33 locally contributes to the Th2 and T_{reg} activity during 702 late stage AE, thus accelerates the course of the disease.









Figure 3.



Figure 4.







Figure 6.



Figure 7.





Supplementary Figure 1. Gating strategy. After an initial data cleaning (removing debris, dead cells and doublets), two different strategies were applied, depending on the antibodies panel. For Panel 1, B cells (CD19⁺) were first isolated, then NK and NKT cells (SSC^{Lo} and NK1.1⁺), which were then discriminated as being CD3⁺ and CD3⁺, respectively. Among NK1.1⁻ cells, CD11b⁺CD3⁻ were identified as myeloid cells, and CD11b⁺CD3⁺ as T cells, further discriminated into CD3⁺CD8⁺ and CD3⁺CD4⁺, which included CD4⁺FoxP3⁺ "T_{reg}" cells. For Panel 2, myeloid cells were isolated as being CD11b⁺Dump⁻ (Dump: CD3, CD19, NK1.1). First, dendritic cells (DC) were identified as MHC-II⁺IiCD11c⁺ cells. Monocytes/macrophages were defined using an "OR" Boolean gate of MHC-II⁺CD11c⁻ cells and MHC-II⁻CD64⁺Ly6C⁺ cells, then discriminated into CD206⁺ and CD206⁻ monocytes/macrophages. Among the MHC-II⁻CD64⁺Ly6C⁺ remaining cells, polymorphonuclear neutrophils (PMN) and polymorphonuclear eosinophils (PME) were defined as Ly6G⁺ and Siglec-F⁺, respectively.



Supplementary Figure 2. Quantification of ST2 surface expression by flow cytometry. Representative histograms of ST2 expression by peritoneal cell populations of WT (blue line) and IL- 33^{++} mice (orange line), and their respective Fluorescence Minus One (FMO) controls (grey line). For each population, Median Fluorescence Intensities (MFI) were plotted in a graph below histogram. Data obtained from one experiment, with 6 WT and 5 IL- 33^{++} mice. Plots show mean ± SD. Significance was tested using the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison *post-hoc* analysis. * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$.



Supplementary Figure 3. Concentrations of cytokines in peritoneal lavages. Cytokines concentrations determined by flow cytometry in peritoneal lavages of WT and IL-33^{-/-} at 4 months post infection. Data obtained from one experiment, with 5 uninfected, 6 WT and 6 IL-33^{-/-} mice. Plots show mean \pm SD. Significance was tested using the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison *post-hoc* analysis. * p \leq 0.05, ** p \leq 0.001, *** p \leq 0.001.



Supplementary Figure 4. Immunofluorescence staining of human alveolar echinococcosis biopsies. Hematoxylin and eosin staining and immunofluorescence staining of consecutive histological sections, using DAPI, anti-IL-33, anti-CD31, and anti-FoxP3 antibodies, for 4 patients with alveolar echinococcosis.

AXE 2 : NOUVELLES PISTES THERAPEUTIQUES DANS L'ECHINOCOCCOSE ALVEOLAIRE

I. Contexte et objectifs

Cet axe repose sur un constat bien connu des professionnels de santé prenant en charge les patients atteints d'EA : le seul traitement curatif de l'EA est la chirurgie radicale, et la seule prophylaxie efficace disponible est celle par benzimidazolé (albendazole ou mébendazole en cas d'indisponibilité de l'albendazole). En effet, l'arsenal thérapeutique disponible contre l'EA est extrêmement réduit. Comme évoqué ci-dessus dans la revue de la littérature, de nombreuses molécules ont été évaluées, et parmi elles certaines se sont avérées efficaces in vitro, mais rares sont celles s'étant montré efficaces in vivo. Ceci s'explique généralement par une biodisponibilité réduite du médicament en raison de paramètres pharmacocinétiques, en particulier dans l'EA où le parasite est entouré de tissus nécrotiques et fibrotiques. L'objectif principal de cet axe de ma thèse consistait donc à développer de nouvelles formulations de principes actifs efficaces contre E. multilocularis in vitro mais insuffisamment in vivo, afin de chercher à s'affranchir des contraintes pharmacocinétiques. Ce projet a été réalisé en collaboration avec l'équipe des Pr Britta Lundstroem-Stadelmann et Pr Andrew Hemphill (Institute of Parasitology, Department of Infectious Diseases and Pathobiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern), spécialisée dans le criblage de principes actifs contre E. multilocularis, et Dr Nolwenn Brandhonneur et Alexis Verger de l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes (ISCR, UMR 6226, Univ Rennes), spécialisés dans la synthèse de nanoparticules. Nos perspectives intègrent également un futur adressage des nanoparticules directement au parasite afin de réduire les potentiels effets indésirables (Figure 15). Ce projet a bénéficié de plusieurs financements de l'Université Rennes 1 (Défis scientifiques, Projet inter-UMR, projet Biosit) et un financement Projet de Recherche International (PRI) Inserm (projet NANOTHERA ECHINO).



Figure 15. Schéma du projet de recherche NANOTHERA-ECHINO.

Ce projet vise à vectoriser des composés hautement actifs *in vitro* contre les métacestodes d'*E. multilocularis* à l'aide de nanoparticules. Les effets hors cible pourront être limités par un adressage par un fragment immunoglobulinique reconnaissant spécifiquement un antigène parasitaire.

Mon travail de thèse étant le point de départ de ce projet, nous avons pris le parti de nous focaliser sur un seul type de nanoparticules, en l'occurrence polymériques : les nanoparticules de poly-(acide lactique co-glycolique) (PLGA). Celles-ci présentent un bon compromis entre stabilité et toxicité, et présentent l'avantage d'être approuvées par la FDA (Food and Drug Agency) pour une utilisation chez l'Homme [416]. Nous avons également sélectionné 4 composés décrits par nos collaborateurs suisses comme étant hautement actifs *in* vitro mais insuffisamment efficaces *in vivo* : la méfloquine, le niclosamide, l'atovaquone et le MMV665807 [318,328,417]. Suite à une étude préliminaire, nous avons déterminé que, parmi ces composés, seule la méfloquine a permis l'obtention de formulations stables et un bon rendement d'encapsulation en nanoparticules de PLGA. L'article présenté ici, en cours de préparation, se concentre donc sur la caractérisation de cette formulation.

II. Résumé

L'EA est une maladie sévère due à l'infection par la forme larvaire d'Echinococcus multilocularis, appelée métacestode. En raison de l'absence de chimiothérapie curative, il est recommandé de prendre en charge les patients atteints d'EA par chirurgie radicale associée à une administration prophylactique d'albendazole ou de mébendazole pendant 2 ans, afin de prévenir les récidives. Il existe un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la pris en charge de l'EA, car ces médicaments ne sont que parasitostatiques et peuvent induire une hépatotoxicité. Cette étude visait à développer un système de vectorisation thérapeutique pour la méfloquine, un composé antiparasitaire hautement actif in vitro contre E. multilocularis, mais faiblement in vivo. Nous avons formulé des nanoparticules de PLGA-PEG-COOH chargée de méfloquine, stables dans leurs propriétés physiques et le contenu en principe actif. Nous avons montré que ces nanoparticules sont capables de traverser la couche striée acellulaire du métacestode, et ainsi d'atteindre la couche germinale qui contient les cellules vivantes du parasite, en moins de 5 min. L'activité de la méfloquine n'était pas altérée au cours du procédé de formulation, comme en témoigne le relargage de l'enzyme EmPGI par les vésicules d'E. multilocularis exposées. Microscopiquement, la méfloquine libre comme la formulation en nanoparticules de PLGA induisaient une altération des vésicules, compatible avec une activité antiparasitaire. Ces observations signifient que les nanoparticules de PLGA contenant de la méfloquine sont de bons candidats pour le traitement de l'EA, car elles peuvent délivrer ce composé hautement directement dans le parasite.

III. Article (en préparation)

1 PLGA nanoparticles are efficient systems for delivery of mefloquine to Echinococcus

2 *multilocularis* metacestodes

- 3 Brice Autier^a, Alexis Verger^b, Britta Lundstroem-Stadelmann^c, Christelle Manuel^d, Marylène
- 4 Chollet-Krugler^b, Nolwenn Brandhonneur^b, Sarah Dion^{d#}
- ^a Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé,
- 6 environnement et travail), UMR_S 1085, Rennes, France
- 7 ^b Univ Rennes, CNRS, ISCR (Institut des Sciences Chimiques de Rennes) UMR 6226, F-
- 8 35000 Rennes, France
- ^o Institute of Parasitology, Department of Infectious Diseases and Pathobiology, Vetsuisse
- 10 Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland
- ^d Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail)
- 12 UMR_S 1085, Rennes, France
- 13 Corresponding author:
- 14 Sarah Dion, <u>sarah.dion@univ-rennes1.fr</u>, +33(0)223234517
- 15 Keywords:
- 16 poly(lactic co-glycolic acid), drug delivery system, alveolar echinococcosis, EmPGI

18 Abstract

19 Alveolar echinococcosis (AE) is a severe disease due to the infection with the Echinococcus multilocularis larva stage, called metacestode. As there is no actual curative chemotherapy, 20 recommendations are to manage AE patients by radical surgery and prophylactic administration 21 of albendazole or mebendazole during 2 years to prevent relapse. There is an urgent need of 22 new therapeutic strategies for management of AE, as these drugs are only parasitostatic, and 23 24 can induce liver injury. This study aimed at developing a drug delivery system for mefloquine, an antiparasitic compound which is highly active in vitro against E. multilocularis but poorly 25 in vivo. We formulated mefloquine-loaded PLGA-PEG-COOH nanoparticles, which were 26 27 stable in their physical properties and their mefloquine encapsulation. We showed that these nanoparticles can cross the outer acellular laminated layer of the metacestode and reach the 28 inner germinal layer, which contains the living cells of the parasite, in less than 5 min. Activity 29 30 of the mefloquine was not altered during the formulation process, as evaluated by the release of EmPGI induced by exposition of the E. multilocularis vesicles. Microscopically, both free 31 and bound mefloquine induced vesicles damage, which was consistent with an antiparasitic 32 activity. Altogether, this means that mefloquine-loaded PLGA nanoparticles are good 33 34 candidates for AE treatment, as it could deliver this highly active compound directly to the 35 parasite.

36 Introduction

Alveolar echinococcosis (AE) is one of the most lethal helminthosis worldwide (1). This 37 infection with the larval stage of Echinococcus multilocularis, so-called metacestode, is due to 38 ingestion of eggs of the parasite which are spread in the environment with feces of wild canids 39 (mainly foxes) infected with the adult stage. The metacestode takes the shape of an hepatic 40 heterogeneous mass, consisting in parasitic microcysts intermingled with host connective 41 42 tissues, and grows indefinitely until its host dies (2). In humans, the host immune response which develops at the periphery of the parasite is a granulomatous response, with a strong 43 infiltration of immune (macrophages, lymphocytes) and stromal cells (fibroblasts, endothelial 44 45 cells) (3). Due to the slow growth of the parasite, AE is often diagnosed years or decades after 46 the contamination, at an advanced stage of the disease characterized by peripheral fibrosis and central necrosis and calcifications. 47

48 Actual recommendation for the management of AE is the combination of radical surgery combined with prophylactic chemotherapy with benzimidazole, i.e. albendazole or 49 mebendazole, during at least 2 years after surgery (4). These drugs are used for AE treatment 50 since more than 40 years (5) and neither better nor equal alternatives are available nowadays. 51 52 However, benzimidazoles are of limited interest, as these compounds are only parasitostatic, 53 meaning that an interruption of the treatment leads to the re-growth of the metacestode (6). Additionally, although these drugs are generally well-tolerated, they can be sometimes difficult 54 to handle by physicians, as their digestive absorption is poor and strongly variable between 55 56 individuals, and as they can cause drug-induced liver injury which can lead to their eviction (7). For these reasons, there is an urgent need of new drugs and therapeutic strategies for treatment 57 of AE. 58

Many compounds were previously evaluated for their activity against *E. multilocularis*metacestodes, either among anti-infective agents (8–11), anti-neoplastic agents (12–14) or other

compounds (15–17). Among them, mefloquine is a promising candidate as it has a strong parasiticidal *in vitro* activity (18–22). However, *in vivo* activity for treatment of mouse peritoneal infections was not satisfactory, as only a high dosage of oral mefloquine allowed to reduce the weight of the parasite, similarly to albendazole treatment (18, 22). Additionally, the oral treatment was only parasitostatic, as the peritoneal metacestodes were able to induce a new infection after inoculation to mice (18).

67 This discrepancy between in vitro and in vivo effect is highly evocative of unfavorable pharmacokinetics of the drug. Indeed, beyond the digestive absorption, the hepatic metabolism 68 and the binding to serum proteins, the drug has to pass through the fibrosis, the necrosis and the 69 70 outer laminated layer of the parasite, composed of mucopolysaccharides, to access the germinal layer which contains the living cells of the metacestode (2). In this aim, we developed 71 mefloquine-loaded polymeric nanoparticles of biodegradable PLGA (poly-(lactic-co-glycolic 72 73 acid)), which is a well characterized and FDA-approved pharmaceutical formulation (23, 24) that we validated *in vitro*. We showed that mefloquine had a high encapsulation rate (more than 74 80%), and that formulated nanoparticles were stable for at least 2 months at 4°C. Additionally, 75 we showed that PLGA nanoparticles were able to pass through the laminated layer of E. 76 77 multilocularis metacestodes, and that in vitro activity of the mefloquine was preserved during 78 the process.

79 MATERIALS AND METHODS

80 *Chemicals*

Acid terminated PLGA 50:50 MW 24,000–38,000 (Resomer® RG503H), anhydrous dichloromethane, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), N-hydroxysuccinimide (NHS), diethyl ether, poly(ethylene glycol) (PEG) bis(amine), dimethylaminopyridine, succinic anhydride, triethylamine, hydrochloric acid, magnesium sulphate, polysorbate, coumarine-6 and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Mefloquine hydrochloride was purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX,
USA). Analytical reagent grade methanol, acetone and acetonitrile were obtained from VWR
international S.A.S. (Fontenay-sous-Bois, France).

89 Synthesis and characterization of PLGA-PEG-COOH polymer

90 Activation of COOH group on PLGA

Dissolved PLGA in anhydrous dichloromethane was reacted with DCC and NHS for 24 h at
room temperature (RT) under nitrogen atmosphere at a stochiometric molar ratio of
PLGA:DCC:NHS of 1:10:10. The by-product N,N'-dicyclohexylurea was removed by filtering
through a 0.45-µm Teflon® syringe filter. The filtrate was precipitated and washed with icecold diethyl ether. The precipitate was vacuum-dried to obtain activated PLGA.

96 Conjugation of PEG with activated PLGA

97 Activated PLGA and PEG bis(amine) were dissolved in anhydrous dichloromethane (1:1 molar
98 ratio) and reacted overnight at RT under argon. The reaction mixture was precipitated and
99 washed with cold methanol. The precipitate was then vacuum dried to obtain PLGA-PEG-NH₂.
100 *Fixation of COOH radical*

PLGA-PEG-NH₂ (300 mg), dimethylaminopyridine (65.3 mg) and succinic anhydride (43.1 mg) were mixed and dried under vacuum for 1 h. Afterwards, triethylamine (42.9 mg) was added and the mixture was dissolved in anhydrous dichloromethane. The reaction was stirred overnight under argon. The crude was then successively washed 3 times with hydrochloric acid at pH=3, 3 times with water and finally 3 times with brine. The organic layer was dried over magnesium sulphate, the solvent evaporated and PLGA-PEG-COOH was isolated with a 99.7% yield.

108 *Characterization of PLGA-PEG-COOH polymer*

109 PLGA, PLGA-PEG-NH₂ and PLGA-PEG-COOH copolymers were analyzed by Fourier-

110 Transform-Infrared (FT-IR) using the VERTEX 70v FT-IR spectrometer (Bruker,

Wissembourg, France) with the following parameters: scan range 4400–400 cm⁻¹, number of 111 scans 16, resolution 4.0 cm⁻¹, interval 1.0 cm⁻¹ and unit %T. Copolymers were also analyzed by 112 proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy using the Bruker Avance 400 MHz 113 NMR spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). The thermal behavior of synthesized 114 copolymer was studied by differential scanning calorimetry (DSC) on a Discovery DSC-25 115 device (TA instruments, New Castle, USA). Samples (approximately 5 mg) were weighed and 116 117 placed in aluminum pans before sealing. Using N₂ as protective gas, samples were heated at a constant rate of 10 °C/min in a temperature range of 0°C to 200°C. The thermogram curves 118 were analyzed with the TRIOS software v5.0 (TA instruments, New Castle, USA). 119

120 Nanoparticles formulation and characterization

121 Nanoparticles formulation

An organic solution in acetone (4 g) of PLGA-PEG-COOH polymer (25 mg), polysorbate 20 122 (75 mg) and either coumarine-6 (13 mg) or mefloquine hydrochloride (13 mg), was slowly 123 added to 15 mL of Water for Injection (0169 according to European Pharmacopoeia) with a 5 124 mL syringe and a 25G needle (Terumo Europe, Leuven, Belgium) under magnetic stirring (450 125 rpm) at room temperature (20–25°C). In these conditions, a bluish colloidal nanosuspension 126 formed instantaneously due to the ouzo effect (25). The acetone was then removed under 127 128 reduced pressure (200 mBar) by a rotary evaporator Laborata 4000 (Heidolph, Schwabach, Germany) for 1 h. The nanosuspensions (called PLGA nanoparticles in the manuscript) were 129 purified by centrifugation (5,000 g, 10 min) to eliminate polymer aggregates and precipitated 130 reagents. Before each further experiment, the formulation was dialyzed against 500 mL of 131 deionized water using a pre-wetted Spectra/PorTM Float-a-LyzerTM G2 device with a molecular 132 weight cutoff of 20 kDa (SpectrumTM, RepligenTM, Castanet Tolosan, France), in order to 133 eliminate unbound and released compounds. 134

135 Nanoparticles characterization

Sizes and zeta potentials of nanoparticles were checked for each batch of nanoparticles using 136 the Malvern Zetasizer Nano ZS device (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom). A 137 calibration curve for dosage of mefloquine in nanoparticles solutions was established by 138 dilutions of a 4 g/L (9.64 mM) initial solution. Mefloquine was initially dissolved in DMSO 139 then diluted with acetonitrile in order to have 120 mg/L, 160 mg/L, 200 mg/L, 240 mg/L and 140 280 mg/L solutions. Samples were diluted at 1:10 with acetonitrile before analysis. Mefloquine 141 concentrations were determined using the 1220 Infinity II LC system (Agilent TechnologiesTM, 142 Dako, Les Ulis, France) with the InfinityLab Poroshell SB-C18 column (Agilent 143 TechnologiesTM, Dako, Les Ulis, France) and the Diode Array Detector for UV detection at 290 144 145 nm. The mobile phase consisted of 50% water, 50% acetonitrile and 0.1% formic acid. Flow rate was 1 mL/min. Mefloquine was quantified by calculating Area Under the Curve (AUC) at 146 the retention time observed during analysis of the standard curve. Analysis was done using the 147 Lab Advisor software (Agilent TechnologiesTM, Dako, Les Ulis, France). 148

149 *Parasite material*

150 *Ethics statement*

All experimental protocols on animals were conducted in compliance with French laws and the institution's guidelines for animal welfare. Authors were authorized to conduct animal experimentation by "La direction des Services Vétérinaires", the project was authorized by the "Comité Régional d'Ethique d'Expérimentation Animale" (CREAA), and license was given by the "Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche", #28586-202011261535409.

156 Animals and infection procedure

Animals were housed in individual cages in specific pathogen-free conditions in conventional
animal facility (Arche platform, Biosit, Rennes) with a 12 h dark-light cycle, under 25°C, 50%
relative humidity and HEPA-filtered air (Forma Scientific, Marietta, OH), with food (2016
Teklad global 16% protein rodent diets, Envigo, Gannat, France) and water *ad libitum*. Briefly,

a clinical isolate of *E. multilocularis* (H95) was maintained *in vivo* by serial peritoneal infections of BALB/c mice (Janvier Laboratories, Le Genest-Saint-Isle, France). Before experiments, metacestodes were collected from an infected mouse, crushed and sieved to remove debris. After an overnight sedimentation in PBS at 4°C, the pellet was washed with PBS and centrifuged 5 min 500 *g* at 4°C. The pellet, which contained microvesicles and germinal cells, was suspended in PBS before peritoneal inoculation or *in vitro* primary culture. *Primary metacestode culture*

For primary metacestode culture, microvesicles and germinal cells obtained from an infected 168 mouse were suspended in 20 mL of DMEM high glucose, pyruvate (GibcoTM, Thermo Fisher 169 170 Scientific, Illkirch, France), supplemented in 10% fetal calf serum (FCS, Eurobio Scientific, Les Ulis, France), 100 U/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin (GibcoTM, Thermo Fisher 171 Scientific, Illkirch, France), and co-cultured with Reuber rat hepatoma (Rh) cells (ATCC #H4-172 II-E-C3) in culture flasks incubated at 37°C under 5% CO₂, as previously described (26). After 173 at least 6 weeks of culture, vesicles were isolated and washed with PBS before further 174 experiments. 175

176 Assessment of PLGA entry

In order to assess if nanoparticles pass through the laminated layer of the parasite, we exposed 177 178 E. multilocularis metacestodes to coumarine-6-loaded PLGA nanoparticles and we detected fluorescence in the germinal layer cells and vesical fluid. In a 2 mL tube, 500 µL of in vitro 179 cultured E. multilocularis vesicles was exposed to 500 µL of a 1:1 dilution in PBS of either 180 181 coumarine-6-loaded or unloaded PLGA-PEG-COOH nanoparticles for 30 min, 90 min or 24 h. The supernatant was sampled, the vesicles were washed 3 times with PBS and the third washing 182 supernatant was sampled. The remaining PBS was removed by careful pipetting, the vesicles 183 were broken, the whole suspension was centrifuged at 500 g for 5 min (RT) and the whole 184 supernatant (vesical fluids) was sampled. The pellet, which contained laminated and germinal 185
layers, was suspended in 200 µL of trypsin-EDTA 0.25% (GibcoTM, Thermo Fisher Scientific, 186 187 Illkirch, France) and incubated 5 min at RT under manual shaking. The suspension was then filtered through 70 µm cell strainers (CorningTM, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, 188 France), the filtrate was centrifuged at 500 g for 5 min (RT), washed with PBS, and after another 189 centrifugation at 500 g for 5 min, the pellet was lysed by 90 µL of a 1% solution of Triton X-190 100TM in PBS (cell extract). Finally, optical density of 90 µL of each sample (nanoparticles 191 192 solution, third wash, vesical fluid, cell extract) was measured at 520 nm under excitation at 450 nm in a black 96-well plate. 193

In vitro cultured *E. multilocularis* vesicles were distributed in 12 wells culture plate and
exposed to a 1:1 dilution in PBS of either coumarine-6-loaded or unloaded PLGA-PEG-COOH
nanoparticles for 5 min, 15 min and 30 min, before to be washed in PBS, fixed in formalin 4%
and re-suspended in PBS. Exposed vesicles were immediately processed in ibidiTM μ-Slide
Angiogenesis with glass bottom (ibidiTM, Munich, Germany) and analyzed by microscopical
examination using the LeicaTM TCS SP8 confocal microscope (LeicaTM, Mannheim, Germany).
Wavelengths of excitation and emission were 488 nm (argon laser) and 500 nm, respectively.

201 In vitro testing of PLGA-PEG-COOH formulations against E. multilocularis metacestodes

202 In vitro drug treatment

Intact 2-4 mm vesicles were isolated by flotation using 2% saccharose solution, extensively washed with PBS and diluted in a 1:1 ratio with DMEM without phenol red (Seraglob, Bioswisstec, Schaffhausen, Switzerland). Then, 1 mL per well was cultured in 48-well culture plate at 37°C under 5% CO₂ and exposed to either 60 μ M unbound mefloquine, 60 μ M mefloquine loaded in PLGA-PEG-COOH nanoparticles, or, as negative controls, to 2% DMSO or to 0.4% blank nanoparticles (without drug). Positive controls were vesicles exposed to 1% Triton X-100. Five and 14 days later, 120 μ L of supernatant was sampled, and finally vesicles were crushed and 120 μ L of supernatant was sampled again. All the supernatants were stored frozen at -20°C until further analysis.

212 *Enzymatic assay*

Activity of mefloquine-loaded PLGA-PEG-COOH nanoparticles was evaluated in vitro by 213 indirect detection of the released EmPGI from the metacestodes, as previously described (27). 214 215 The assay is based on an enzymatic reaction initiated by extemporaneous addition of fructose-6-phosphate to a reactional mix containing EmPGI (putatively in supernatant), 4,4.10⁻¹ mM β -216 nicotinamide adenine dinucleotide hydrate, 1,8 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 217 8,8.10⁻¹ mM EDTA and 100 mM Tris-HCl (all reagents from Sigma Aldrich, Saint-Quentin-218 219 Fallavier, France). In presence of EmPGI, NADH,H⁺ was generated and detected by continuous detection of absorbance at 340 nm during 30 min using the SPECTROstarTM Nano 220 spectrophotometer (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France). For each condition, 221 222 enzyme blank (no substrate) was performed in duplicate, and reaction was performed in triplicate. For each time point, the mean of the enzyme blank was subtracted from the mean of 223 the reaction. A nonlinear regression curve was then fitted for each condition using GraphPad 224 Prism software v8.0.2 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Drug activity (proportion of released 225 EmPGI expressed as % Triton X-100) was calculated from the initial slope (which was 226 227 proportional to the quantity of EmPGI) for supernatant (released EmPGI) and for crushed vesicles suspension (total EmPGI) using Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft France, Issy-228 229 les-Moulineaux, France).

230 Statistical analysis

Statistical analysis and plots of data were done using GraphPad Prism software v8.0.2 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). The α risk was set to 0.05 for all analyses, and the same representation of significance was used throughout the manuscript: * p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001. Stability of each physical characteristic of the mefloquine-loaded PLGA nanoparticles was analyzed using the non-parametric Friedman test for paired data, with *post- hoc* Dunn's multiple comparisons test. Fluorescence intensities and antiparasitic activities were
 compared using the two-way ANOVA test. *Post-hoc* analysis compared all compounds to each

other within a timepoint using the Tukey's multiple comparison test.

239 **RESULTS**

240 Characterization of PLGA-PEG-COOH polymer

241 The successful formation of PLGA-PEG-COOH polymer was confirmed by FT-IR (Figure 1).

242 The overall spectral pattern has not changed post grafting of PLGA-PEG-NH₂. After addition

of -COOH terminal group, the spectra exhibited a broad O-H stretching at $3200-3650 \text{ cm}^{-1}$,

244 C=O stretching at 1720 cm⁻¹ and C-O stretching at 1050 cm⁻¹ which corresponded to

245 carboxylic groups.

246 Differential scanning calorimetry (DSC) measurements were performed on copolymers, to

247 investigate differences of glass transition temperature (Tg) during chemical transformation

248 (Figure 2). For native PLGA, Tg was around 36.1°C and decreased to 30.4°C after grafting of

249 PLGA-PEG-NH₂. After transformation to PLGA-PEG-COOH copolymer, Tg increase again

to 34.9°C. These slight variations show that chemical transformation was effective, without

251 radical modification of this physical characteristic.

252 Characterization of nanoparticles

At synthesis, the size of the mefloquine-loaded nanoparticles was 128.7 ± 5.5 nm with low

polydispersity index (PDI) of 0.11 ± 0.00 (monodisperse system if PDI < 0.2 (28)) and a

satisfying (< 30 mV) zeta potential of $-21.2 \pm 5.8 \text{ mV}$ (Table 1). Size and PDI were stable

during at least 7 days. Zeta potential was significantly different between the synthesis and 1

- day later, as showed by the *post-hoc* Dunn's test (p < 0.05), and was then stable. This
- difference did not prevent its use, as zeta potential was inferior to 30 mV for each timepoint.
- 259 The mean encapsulation rate was 81%, which was equivalent to a mean concentration of 5.1

260 mM mefloquine of nanoparticle solutions. Encapsulation of mefloquine was stable during at
261 least 2 months at 4°C (data not shown).

262 Entry of PLGA nanoparticles in metacestode

After exposition of *E. multilocularis* metacestodes to coumarine-6-loaded nanoparticles during 30 min, fluorescence was detected by spectrofluorimetry in germinal layer cells extract, and, to a lesser extent, in vesical fluid (Figure 3). After 90 min of exposition, fluorescence was detected equally in both vesical fluid germinal layer cells extract. Finally, after 24 h of exposition, fluorescence intensity was high in cells extract and vesical fluid, equally with the solution of nanoparticles. Fluorescence was not detected in vesicles not exposed to coumarine-6-loaded nanoparticles (data not shown).

Confocal microscopy showed that 5 min of exposition was enough to detect coumarine-6 in
germinal layer (Figure 4). Fluorescence was observed in the cells of the germinal layer but not
in the laminated layer. Exposition to blank PLGA nanoparticles did not lead to fluorescence in
the metacestodes.

274 In vitro activity against E. multilocularis metacestodes

After 5 days of exposition to 60 µM mefloquine, EmPGI release from the metacestode was 275 77.7% of the Triton X-100 (Figure 5A). The same exposition time to 60 µM mefloquine loaded 276 277 in PLGA nanoparticles lead to a 58.5% of EmPGI compared to Triton X-100, which was slightly lower but not significantly different. Both were significantly higher than the DMSO 278 and blank nanoparticles controls, respectively of 10.6% and 0.5% of Triton X-100. Similar 279 280 results were observed after 12 days of exposition, with 60 µM mefloquine and 60 µM mefloquine-loaded nanoparticles having activities of 78.4% and 90.1% of Triton X-100, 281 respectively. Microscopical observation of the metacestodes showed that E. multilocularis 282 vesicles exposed to both free and loaded mefloquine were broken, on contrary to vesicles 283 exposed to DMSO or blank nanoparticles (Figure 5B). 284

285 **DISCUSSION**

286 Treatment of AE is suffering from a lack of therapeutic possibilities, especially in terms of available and efficient antiparasitic drugs. In this preliminary study, we aimed at developing a 287 new formulation of an *in vitro* active drug, mefloquine, in order to improve its pharmacokinetics 288 (18, 20, 22). We showed that the formulation of mefloquine in PLGA nanoparticles was 289 reproducible and stable in time for physical properties and mefloquine encapsulation. Size, PDI 290 291 and zeta potential were compatible with an *in vivo* administration, and the slight change of zeta potential which occurred during the first day did not challenge this. Also, we showed that PLGA 292 nanoparticles were able to cross the laminated layer of the parasite, composed of 293 294 polysaccharides, and to reach germinal cells in less than 5 min. We also showed that the encapsulation process of the mefloquine did not alter its activity against the parasite, as the 295 release of EmPGI was similar for both free and loaded mefloquine. 296

297 This study was the first step to elaborate new therapeutic strategies for AE treatment. Further 298 studies will aim at describing the biodistribution of the PLGA-PEG-COOH using in vivo mouse model of hepatic infection with E. multilocularis, in order to verify that periparasitic fibrosis 299 does not prevent the nanoparticles to reach the metacestode (29). Indeed, this putative treatment 300 301 failure mechanism is highly suspected, as immunocompromised patients, who develop a weaker 302 periparasitic response (including fibrosis), are more responsive to benzimidazole treatments (30). Then, we will evaluate activity of the mefloquine-loaded PLGA nanoparticles in in vivo 303 model of mouse AE. In previous studies, high dosage of unbound mefloquine was shown to 304 305 have a moderate effect in mice infected with E. multilocularis and was not parasiticidal, similarly to albendazole (18, 22). Drug delivery by nanoparticles could improve this activity, 306 307 putatively by increasing the distribution of mefloquine to the parasite, and could allow to use lower dosages, as observed with albendazole-loaded nanoparticles (31–33). However, it seems 308 possible that mefloquine remains parasitostatic, even loaded in PLGA nanoparticles (6). This 309

would not be disappointing, as having at least one alternative to benzimidazole would bealready a step forward in the field of AE management.

We evaluated activities of PLGA-PEG-COOH nanoparticles instead of the historical PLGA nanoparticles (34). PLGA nanoparticles are known to be easily opsonized and cleared by the reticular endothelial system, and PEGylation of the nanoparticles increases their biological halflife (35). Engraftment of a -COOH radical was not guided by a pharmacokinetic need but can be a site for binding of an antigen-binding protein, e.g. a monoclonal antibody (36). Depending on the toxicity of the formulation, it might be better to address the nanoparticles to the parasite, in order to reduce side effects due to off-target activity (37).

Few studies evaluated drug delivery systems for treatment of AE. The first one evaluated doxorubicin-loaded polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles (38), then were evaluated multiple formulations of albendazole (31–33, 39), and recently a study successfully treated AE infected mice with magnetic nanoparticles (PLGA-Fe) loaded with E2-a, an alkaloid compound extracted from the traditional Tibetan medicine *Sophora moorcroftiana* (40). If most of these studies highlighted improvement or at least equal activity of these formulations compared to albendazole tablets, only the latter focused on a non-cytotoxic and non-benzimidazole drug.

326 In summary, this study showed that PLGA nanoparticles were efficient drug delivery systems 327 in vitro for E. multilocularis metacestodes, as it crosses rapidly the laminated layer of the parasite. Mefloquine was easily encapsulated in PLGA nanoparticles, with an encapsulation 328 rate of 80% allowing optimal production of mefloquine-loaded nanoparticles. Formulations are 329 330 stable in time, which makes the therapeutic use possible. We also showed that *in vitro* activity was similar between free and encapsulated mefloquine. This means that mefloquine-loaded 331 PLGA nanoparticles are good candidates for AE treatment, as it could deliver this highly active 332 compound directly to the parasite. 333

334 ACKNOWLEDGMENTS

- 335 Authors have no conflict of interest to declare.
- This study was funded by Université Rennes 1 ("Défis scientifiques", "Projet inter-UMR" and
- 337 "Financement BIOSIT" grants) and Inserm "Projet de Recherche International" (PRI) grant
- 338 (NANOTHERA-ECHINO). Contribution of Britta Lundstroem-Stadelmann was supported by
- the SNSF project 310030_192072 fund.
- 340 The authors thank the whole Irset Team 2. We thank the SFR Biosit UMS CNRS 3480-
- 341 INSERM 018, Rennes (https://biosit.univ-rennes1.fr/) MRIc platform and the Arche animal
- 342 house platform.

358 **REFERENCES**

- Casulli A. 2020. Recognising the substantial burden of neglected pandemics cystic and alveolar
 echinococcosis. Lancet Global Health 8:e470–e471.
- 2. Vuitton DA, McManus DP, Rogan MT, Romig T, Gottstein B, Naidich A, Tuxun T, Wen H,
- 362 Silva AM da, Vuitton DA, McManus DP, Romig T, Rogan MR, Gottstein B, Silva AM da, Wen
- 363 H, Naidich A, Tuxun T, Avcioglu A, Boufana B, Budke C, Casulli A, Güven E, Hillenbrand A,
- Jalousian F, Jemli MH, Knapp J, Laatamna A, Lahmar S, Naidich A, Rogan MT, Sadjjadi SM,
- 365 Schmidberger J, Amri M, Bellanger A-P, Benazzouz S, Brehm K, Hillenbrand A, Jalousian F,
- 366 Kachani M, Labsi M, Masala G, Silva AM da, Seyed MS, Soufli I, Touil-Boukoffa C, Wang J,
- 367 Zeyhle E, Aji T, Akhan O, Bresson-Hadni S, Dziri C, Gräter T, Grüner B, Haïf A, Hillenbrand
- 368 A, Koch S, Rogan MT, Tamarozzi F, Tuxun T, Giraudoux P, Torgerson P, Vizcaychipi K, Xiao
- 369 N, Altintas N, Lin R, Millon L, Zhang W, Achour K, Fan H, Junghanss T, Mantion GA. 2020.
- 370 International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. Parasite 27:41.
- Vuitton DA, Zhang SL, Yang Y, Godot V, Beurton I, Mantion G, Bresson-Hadni S. 2006.
 Survival strategy of *Echinococcus multilocularis* in the human host. Parasitol International
 55:S51–S55.
- Brunetti E, Kern P, Vuitton DA. 2010. Expert consensus for the diagnosis and treatment of
 cystic and alveolar echinococcosis in humans. Acta Tropica 114:1–16.
- Schantz PM, Van den Bossche H, Eckert J. 1982. Chemotherapy for larval echinococcosis in
 animals and humans: report of a workshop. Z Parasitenkd 67:5–26.
- 378 6. Lundström-Stadelmann B, Rufener R, Ritler D, Zurbriggen R, Hemphill A. 2019. The
- importance of being parasiticidal... an update on drug development for the treatment of alveolar
 echinococcosis. Food Waterborne Parasitol 15:e00040.
- 381 7. Burkert S, Peters L, Bloehdorn J, Grüner B. 2022. Salvage therapy for alveolar echinococcosis-a
 382 case series. Pathogens 11:333.

383	8.	Küster T, Kriegel N, Boykin DW, Stephens CE, Hemphill A. 2013. In vitro and in vivo activities
384		of dicationic diguanidino compounds against Echinococcus multilocularis metacestodes.
385		Antimicrob Agents Chemother 57:3829–3835.

- 386 9. Rufener R, Dick L, D'Ascoli L, Ritler D, Hizem A, Wells TNC, Hemphill A, Lundström-
- 387 Stadelmann B. 2018. Repurposing of an old drug: In vitro and in vivo efficacies of
- buparvaquone against *Echinococcus multilocularis*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 8:440–450.
- 10. Spicher M, Roethlisberger C, Lany C, Stadelmann B, Keiser J, Ortega-Mora LM, Gottstein B,
- Hemphill A. 2008. In vitro and in vivo treatments of *Echinococcus* protoscoleces and
- metacestodes with artemisinin and artemisinin derivatives. Antimicrob Agents Chemother
 52:3447–3450.
- 393 11. Stadelmann B, Rufener R, Aeschbacher D, Spiliotis M, Gottstein B, Hemphill A. 2016.
 394 Screening of the open source malaria box reveals an early lead compound for the treatment of

alveolar echinococcosis. PLoS Negl Trop Dis 10:e0004535.

- Joekel DE, Lundström-Stadelmann B, Müllhaupt B, Hemphill A, Deplazes P. 2018. Evaluation
 of kinase-inhibitors nilotinib and everolimus against alveolar echinococcosis in vitro and in a
 mouse model. Exp Parasitol 188:65–72.
- 399 13. Stadelmann B, Aeschbacher D, Huber C, Spiliotis M, Müller J, Hemphill A. 2014. Profound
 400 activity of the anti-cancer drug bortezomib against *Echinococcus multilocularis* metacestodes
 401 identifies the proteasome as a novel drug target for cestodes. PLoS Negl Trop Dis 8:e3352.
- 402 14. Hemer S, Brehm K. 2012. In vitro efficacy of the anticancer drug imatinib on *Echinococcus* 403 *multilocularis* larvae. Int J Antimicrob Agents 40:458–462.
- 404 15. Gao H-J, Sun X-D, Luo Y-P, Pang H-S, Ma X-M, Zhang T, Jing T, Hu W, Shen Y-J, Cao J-P.
- 405 2021. Anti-echinococcal effect of verapamil involving the regulation of the calcium/calmodulin-

- 406 dependent protein kinase II response in vitro and in a murine infection model. Parasit Vectors407 14:108.
- 408 16. Loos JA, Dávila VA, Brehm K, Cumino AC. 2020. Metformin suppresses development of the
 409 *Echinococcus multilocularis* larval stage by targeting the TOR pathway. Antimicrob Agents
 410 Chemother 64:e01808-19.
- 411 17. Liu C, Fan H, Ma J, Ma L, Ge R-L. 2021. In vitro and in vivo efficacy of thiacloprid against
 412 *Echinococcus multilocularis*. Parasit Vectors 14:450.
- 413 18. Küster T, Stadelmann B, Rufener R, Risch C, Müller J, Hemphill A. 2015. Oral treatments of
- *Echinococcus multilocularis*-infected mice with the antimalarial drug mefloquine that potentially
 interacts with parasite ferritin and cystatin. Int J Antimicrob Agents 46:546–551.
- 416 19. Küster T, Stadelmann B, Hermann C, Scholl S, Keiser J, Hemphill A. 2011. In vitro and in vivo
 417 efficacies of mefloquine-based treatment against alveolar echinococcosis. Antimicrob Agents
 418 Chemother 55:713–721.
- 20. Lundström-Stadelmann B, Rufener R, Hemphill A. 2020. Drug repurposing applied: Activity of
 the anti-malarial mefloquine against *Echinococcus multilocularis*. Int J Parasitol Drugs Drug
 Resist 13:121–129.
- 422 21. Stadelmann B, Küster T, Scholl S, Barna F, Kropf C, Keiser J, Boykin DW, Stephens CE,

423 Hemphill A. 2011. In vitro efficacy of dicationic compounds and mefloquine enantiomers

- 424 against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. Antimicrob Agents Chemother 55:4866–
- **425** 4872.
- 426 22. Rufener R, Ritler D, Zielinski J, Dick L, da Silva ET, da Silva Araujo A, Joekel DE, Czock D,
- 427 Goepfert C, Moraes AM, de Souza MVN, Müller J, Mevissen M, Hemphill A, Lundström-
- 428 Stadelmann B. 2018. Activity of mefloquine and mefloquine derivatives against *Echinococcus*
- 429 *multilocularis*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 8:331–340.

430	23.	Verger A, Dollo G, Martinais S, Molard Y, Cordier S, Amela-Cortes M, Brandhonneur N. 2022.
431		Molybdenum-iodine cluster loaded polymeric nanoparticles allowing a coupled therapeutic
432		action with low side toxicity for treatment of ovarian cancer. J Pharm Sci S0022-
433		3549(22)00413–0.

- 434 24. Wang Y, Qin B, Xia G, Choi SH. 2021. FDA's Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) research
 435 program and regulatory outcomes. AAPS J 23:92.
- 436 25. Ganachaud F, Katz JL. 2005. Nanoparticles and nanocapsules created using the Ouzo effect:
 437 spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices.

438 Chemphyschem 6:209–216.

- 439 26. Stadelmann B, Spiliotis M, Müller J, Scholl S, Müller N, Gottstein B, Hemphill A. 2010.
- *Echinococcus multilocularis* phosphoglucose isomerase (EmPGI): a glycolytic enzyme involved
 in metacestode growth and parasite-host cell interactions. Int J Parasitol 40:1563–1574.
- Stadelmann B, Scholl S, Müller J, Hemphill A. 2010. Application of an in vitro drug screening
 assay based on the release of phosphoglucose isomerase to determine the structure-activity
 relationship of thiazolides against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. J Antimicrob
 Chemother 65:512–519.
- 28. Caputo F, Clogston J, Calzolai L, Rösslein M, Prina-Mello A. 2019. Measuring particle size
- distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-
- 448 NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity.
- 449 J Controlled Release 299:31–43.
- Yang N, Ma W, Ke Y, Liu H, Chu J, Sun L, Lü G, Bi X, Lin R. 2022. Transplantation of
 adipose-derived stem cells ameliorates *Echinococcus multilocularis*-induced liver fibrosis in
 mice. PLoS Negl Trop Dis 16:e0010175.

453	30.	Chauchet A, Grenouillet F, Knapp J, Richou C, Delabrousse E, Dentan C, Millon L, Di Martino
454		V, Contreras R, Deconinck E, Blagosklonov O, Vuitton DA, Bresson-Hadni S, FrancEchino
455		Network. 2014. Increased incidence and characteristics of alveolar echinococcosis in patients
456		with immunosuppression-associated conditions. Clin Infect Dis 59:1095–1104.
457	31.	Dvoroznáková E, Hrcková G, Borosková Z, Velebný S, Dubinský P. 2004. Effect of treatment
458		with free and liposomized albendazole on selected immunological parameters and cyst growth in
459		mice infected with <i>Echinococcus multilocularis</i> . Parasitol Int 53:315–325.
460	32.	Wen H, New RR, Muhmut M, Wang JH, Wang YH, Zhang JH, Shao YM, Craig PS. 1996.
461		Pharmacology and efficacy of liposome-entrapped albendazole in experimental secondary
462		alveolar echinococcosis and effect of co-administration with cimetidine. Parasitology 113
463		(2):111–121.
464	33.	Abulaihaiti M, Wu X-W, Qiao L, Lv H-L, Zhang H-W, Aduwayi N, Wang Y-J, Wang X-C,
465		Peng X-Y. 2015. Efficacy of albendazole-chitosan microsphere-based treatment for alveolar
466		echinococcosis in mice. PLoS Negl Trop Dis 9:e0003950.
467	34.	Venier-Julienne MC, Benoît JP. 1996. Preparation, purification and morphology of polymeric
468		nanoparticles as drug carriers. Pharm Acta Helv 71:121–128.
469	35.	Zhang D, Liu L, Wang J, Zhang H, Zhang Z, Xing G, Wang X, Liu M. 2022. Drug-loaded PEG-
470		PLGA nanoparticles for cancer treatment. Front Pharmacol 13:990505.
471	36.	Lee CK, Atibalentja DF, Yao LE, Park J, Kuruvilla S, Felsher DW. 2022. Anti-PD-L1 F(ab)
472		conjugated PEG-PLGA nanoparticle enhances immune checkpoint therapy. Nanotheranostics
473		6:243–255.
474	37.	Friedman AD, Claypool SE, Liu R. 2013. The smart targeting of nanoparticles. Curr Pharm Des
475		19:6315–6329.

476	38.	Liance M, Nemati F, Bories C, Couvreur P. 1993. Experience with doxorubicin-bound
477		polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles on murine alveolar echinococcosis of the liver. Int J
478		Parasitol 23:427–429.

- 39. Rodrigues JM, Bories C, Emery I, Fessi H, Devissaguet JP, Liance M. 1995. Development of an
 injectable formulation of albendazole and in vivo evaluation of its efficacy against *Echinococcus multilocularis* metacestode. Int J Parasitol 25:1437–1441.
- 482 40. Li Z, Zhang G, Luo Y, Gao Q, Wang J, Chen C, Xu X, Zhao Y, Li T, Ma X. 2020. In vivo effect
 483 of magnetic microspheres loaded with E2-a in the treatment of alveolar echinococcosis. Sci Rep
 484 10:12589.

487	Table 1. Physical characteristics of the mefloquine-loaded PLGA nanoparticles. Once
488	formulated, nanoparticles were stored at 4°C and reanalyzed at each time point. Data are
489	expressed as $m \pm SD$ of 3 independent experiments. Data were analyzed using the Friedman
490	test. PDI polydispersity index. ** p<0.01.

	Time since formulation (days)					Statistical	
	0	1	2	3	4	7	significance
Size (nm)	128.7 ± 5.5	134.7 ± 6.8	132.7 ± 7.7	129.3 ± 7.6	128.0 ± 6.6	128.4 ± 2.9	ns
PDI	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	ns
Zeta							
potential	-21.2 ± 5.8	-13.7 ± 5.3	-15.4 ± 4.9	-16.3 ± 5.5	-16.4 ± 5.9	-19.5 ± 6.0	**
(mV)							



Figure 1. Fourier Transform-Infrared spectra of PLGA-PEG-COOH (A), PLGA-PEG-NH₂

(B) and PLGA (C). The typical stretchings for O-H, C=O and C-O bounds were annotated in

495 (A).



Figure 2. Differential scanning calorimetry thermograms of PLGA polymers.



500

501 Figure 3. Fluorimetry of supernatants and metacestode fractions after exposition to coumarine-6-loaded PLGA nanoparticles. (A) E. multilocularis metacestodes were exposed to coumarine-502 6-loaded nanoparticles during 30 min, 90 min or 24 h, washed, and vesical fluid and germinal 503 layer cells were obtained by mechanical disruption of the vesicles. Four samples were collected: 504 the solution of nanoparticles, the third wash solution, the extract of germinal layer cells and the 505 506 vesical fluid. (B) Plot showing fluorescence intensity at 520 nm under 450 nm excitation of the previously collected samples. For each condition, plot shows pooled data from 4 independent 507 508 experiments, mean and SD. Data were compared using two-way ANOVA and post-hoc Tukey's multiple comparison test. ** p<0.01, *** p<0.001. 509



Figure 4. Confocal microscopy of *Echinococcus multilocularis* vesicles. Metacestodes were
exposed to either coumarine-6-loaded PLGA nanoparticles during 5 min (A), coumarine-6loaded PLGA nanoparticles during 30 min (B) or blank PLGA nanoparticles during 30 min (C).
In (A) and (B), fluorescence can be observed in the inner germinal layer (arrows), and not the
outer laminated layer (arrowheads). Observations were representative of 2 independent
experiments.



519 Figure 5. Activity of compounds against Echinococcus multilocularis metacestode. (A) Plot showing in vitro release of EmPGI expressed in percentage of the positive control (Triton X-520 521 100). Data obtained from one experiment. Data were compared using two-way ANOVA and post-hoc Tukey's multiple comparison test. * p<0.05, ** p<0.01, ** p<0.001. (B) Pictures of 522 the vesicles after 12 days of *in vitro* exposition to the indicated treatment. Vesicles were broken 523 when exposed to 60 µM mefloquine, 60 µM mefloquine-loaded PLGA nanoparticles 524 (mefloquine-NP) and Triton X-100. Morphology of vesicles was not altered when exposed to 525 DMSO or unloaded PLGA nanoparticles (blank NP). Pictures are representative of one 526 527 experiment.

PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

Mes travaux ont mis en évidence le rôle de l'IL-33 endogène périparasitaire dans l'accélération de la croissance du métacestode en phase tardive. Si la cytokine n'est pas indispensable à la survenue de la maladie, elle contribue à son développement en orientant le microenvironnement périlésionnel vers un profil tolérogène. D'après nos observations, en particulier le profil cytokinique et la proportion de macrophages M2 du péritoine, il semble probable que cet effet soit médié par les lymphocytes T_{reg} et les macrophages, toutefois notre schéma expérimental ne permet pas formellement de s'en assurer. Le meilleur moyen d'évaluer le rôle des lymphocytes T_{reg} serait de répéter une expérimentation *in vivo* par inoculation péritonéale de métacestodes, avec des souris mutantes présentant une délétion conditionnelle du récepteur ST2 sur les lymphocytes T_{reg}, comme par exemple le modèle *ll1r/11^{fh/fl}FoxP3*^{YFPCre} et un groupe contrôle de souris *ll1r/11^{+/+}FoxP3*^{YFPCre} [212]. La comparaison des deux groupes permettrait d'élucider si la différence de développement parasitaire, de profil cytokinique et de polarisation des macrophages observée entre souris WT et IL-33^{-/-} est bien due à l'activité des lymphocytes T_{reg}. Si les mêmes différences sont toujours perceptibles entre les deux groupes, l'impact de l'IL-33 est alors imputable à un autre type cellulaire, possiblement les macrophages.

Prouver la responsabilité des macrophages serait plus complexe, car il n'existe pas de marqueur pleinement spécifique des macrophages permettant de faire une délétion conditionne, et une déplétion systémique en macrophages, comme fait usuellement avec des liposomes de clodronate, conduirait à favoriser le développement de l'infection [62]. La réponse monomacrophagique au cours de l'EA est un champ de recherche encore peu exploré. Afin de répondre à ce manque dans les connaissances scientifiques, nous avons pour projet de caractériser l'évolution cinétique des populations de monocytes-macrophages recrutés sur le site d'infection à l'aide de la technologie de cytométrie de masse ou CyTOF (*Cytometry by Time Of Flight*) (Figure 16A). Cette technique permet, à l'aide d'anticorps couplés à des métaux, de réaliser un immunophénotypage hautement multiplexé (jusqu'à plus de 30 marqueurs), permettant une description fine des populations immunitaires. L'analyse peut notamment faire appel à des algorithmes d'analyses non supervisées (sans *a priori*) de réductions de dimensions (Opt-tSNE [418], UMAP [419]) et de *clustering* (FlowSOM [420]). Ce projet a déjà bénéficié d'un financement pour la constitution du panel (Défis scientifiques de l'Université Rennes 1), dont les anticorps sont déjà couplés et en cours de titration (Figure 16B).

A Antibody 1 Antibody 3 Antibody 2 Antibody N Staining of single-cell suspensions with antibodies that recognize markers of interest	B	Cellules stro ¹⁶³ Dy-Epcam ¹⁶⁵ Ho-CD31 ¹⁶⁷ Er-gp38	omales		
ل ا		Lymphocyte	S		
Introduction of stained single-cell suspension into the mass cytometer Nebulizer		¹⁴⁵ Nd-CD4 ¹⁴⁶ Nd-CD43 ¹⁴⁷ Sm-CD103 ¹⁴⁹ Sm-CD19 ¹⁵² Sm-CD3ε	¹⁵³ Eu-CD8α ¹⁵⁵ Gd-RORγt ¹⁶⁶ Er-FoxP3 ¹⁷³ Yb-NK1.1 ¹⁷⁶ Yb-B220	⁸⁹ Y-CD45	
		Polynucléaires			
Ion cloud	62 mg	¹⁴¹ Pr-Ly6G ¹⁷² Yb-Siglec-F			¹⁴⁸ Nd-CD11b
Droplet nebulization and plasma-based ionization Quadrupole Orthogonal TOF mass spectrometer Filtering of low mass ion species and TOF-based quantification Mass signal integration for each measured cell		Monocytes, cellules den ¹¹⁶ Cd-CD204 ¹⁴² Nd-CD11c ¹⁴⁴ Nd-CD115 ¹⁵¹ Eu-CD64 ¹⁵⁴ Sm-CD163 ¹⁵⁶ Gd-MERTK ¹⁵⁸ Gd-CCR2 ¹⁵⁹ Th-F4/80	macrophage dritiques ¹⁶² Dy-Ly6C ¹⁶⁴ Dy-CX3CR1 ¹⁶⁸ Er-DC-SIGN ¹⁶⁹ Tm-Arginase ¹⁷⁰ Er-CD169 ¹⁷¹ Yb-CD172a ¹⁷⁴ Yb-Siglec-H ¹⁷⁵ Ly-CD206	25,	
N-dimensional single-cell data		¹⁶⁰ Gd-HIF-1α ¹⁶¹ Dy-iNOS	²⁰⁹ Bi-MHCII		

Figure 16. Schéma explicatif de la technologie de cytométrie de masse.

(A) La cytométrie de masse repose sur le marquage de cellules par des anticorps couplés à des métaux lourds, l'isolement des cellules par un nébuliseur, et leur analyse par spectrométrie de masse. Après nébulisation, les cellules sont ionisées dans une torche à plasma et les métaux lourds sont détectés dans un quadrupôle en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Extrait de [421]. (B) Composition de notre panel de cytométrie de masse en cours de titration. La figure a été partiellement générée à l'aide de Servier Medical Art, fourni par Servier, sous licence Creative Commons Attribution 3.0 unported

Outre le rôle même de l'IL-33, notre étude pose la question de la place que détient la néovascularisation dans l'EA. En effet, l'EA est souvent comparée à un cancer pour sa présentation clinique, son évolution, sa possible dissémination métastatique et sa physiopathologie. L'échinococcose kystique à *E. granulosus* y est souvent opposée pour sa plus simple prise en charge et son meilleur pronostic. Dans la littérature, aucune description robuste d'une néoangiogénèse périparasitaire n'a été faite pour l'infection à *E. granulosus*. Pourrait-il s'agir d'une différence fondamentale dans la physiopathologie des deux infections? Les néovaisseaux autour des métacestodes d'*E. multilocularis* apportent, en plus des nutriments et de l'oxygène, des médiateurs inflammatoires, dont les cytokines Th2 systémiques en phase tardive, mais aussi, comme nous l'avons montré, de l'IL-33 par leurs cellules endothéliales, favorisant le développement de l'infection. De plus, certaines des cellules endothéliales IL-33⁺ que nous avons observées sur les coupes de foies humains

infectés par E. multilocularis ont une morphologie compatible avec les HEC (High Endothelial Cells, cellules endothéliales plus épaisses, moins étalées). Les HEC sont les cellules endothéliales des HEV, ces vaisseaux retrouvés dans les organes lymphoïdes ou sur des sites inflammatoires chroniques et impliqués dans le recrutement de lymphocytes [422]. Il serait bon de mieux caractériser la néoangiogénèse autour du métacestode d'E. multilocularis, par exemple à l'aide de co-marquages immunofluorescents ciblant CD31 (cellules endothéliales), MECA-79 (HEC) et MAdCAM-1 (HEC inflammatoires) sur nos blocs de tissus humains infectés. Si ces vaisseaux HEV venaient à être en effet présents autour du parasite, leur implication dans le développement de la pathologie doit être déterminée. En particulier, vu leur rôle dans le recrutement des cellules lymphoïdes, il est tout à fait possible qu'ils soient impliqués dans la mise en place de la phase tardive de l'EA par l'intermédiaire des lymphocytes Th2 et T_{reg}, tout comme ils pourraient être déterminants dans l'issue de la phase initiale de la maladie, à savoir le contrôle ou non de l'infection [423]. Après mise en évidence de la présence de ces HEV chez la souris, il serait alors possible d'étudier leur impact en traitant des souris infectées par E. multilocularis avec des agonistes ou antagonistes de LTBR, respectivement connus pour stimuler et réprimer la formation des HEV [424]. La période de traitement (phase initiale, phase tardive) conditionnerait alors l'interprétation du rôle de ces HEV.

Concernant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, les résultats présentés dans ce manuscrit en préparation sont particulièrement encourageants. Si le test du PGI devra être confirmé sur au moins deux autres expérimentations indépendantes, nos observations suggèrent que la formulation en nanoparticules de PLGA maintient l'activité de la méfloquine, et permet son transport dans la couche germinale. Il nous faudra également en déterminer la biodistribution, et en particulier s'assurer que les nanoparticules de PLGA-PEG-COOH atteignent le métacestode dans sa localisation hépatique. Pour cela, nous nous dirigeons actuellement vers une évaluation par imagerie in vivo par fluorescence proche infrarouge [425,426]. Le fluorophore sera greffé à la surface des nanoparticules, celles-ci seront administrées par voie IV et la détection sera effectuée par un dispositif d'imagerie optique in vivo du type NIR-II (Kaer Labs, Nantes, France). Cette technologie permettra une quantification cinétique de la distribution tissulaire des nanoparticules. La technique sera d'abord réalisée sur des souris non-infectées, afin d'évaluer la distribution en situation non pathologique, puis dans un second temps sur des souris présentant des lésions hépatiques (infection primaire ou secondaire). Une fois la biodistribution validée, nous pourrons conduire une étude de l'efficacité in vivo, après une étude préliminaire visant à déterminer la dose non toxique administrable. Afin de se mettre dans une situation la plus proche possible de l'infection humaine, nous devrons également employer un modèle d'infection hépatique, et débuter le traitement en phase tardive de la maladie, c'est-à-dire après 2 mois d'infection.

La vectorisation du principe actif par les nanoparticules, et l'augmentation théorique de son volume de distribution qui en découle, peut conduire à atteindre des sites habituellement inaccessibles lors d'un traitement systémique conventionnel. Si cet effet est ici recherché pour atteindre les cellules du métacestode, la contrepartie est un risque de voir se développer des effets indésirables liés à ces effets « hors cible ». Afin de minimiser ces potentiels effets indésirables, ce projet de recherche développe en parallèle des moyens d'adresser les nanoparticules au parasite. Notre cible étant un agent infectieux, le moyen le plus simple pour cela est d'utiliser une immunoglobuline permettant la reconnaissance d'un antigène spécifique du parasite. Nous avons choisi le single chain Fragment Variable (scFv) comme moyen d'assurer cette fonction. Les scFv sont des fragments immunoglobuliniques (environ 30 kDa contre 150 kDa pour un anticorps complet), conçus à partir de séquences d'anticorps monoclonaux et constitués d'une seule chaîne peptidique produite de façon recombinante [427,428]. Les scFv sont donc de production et de modification bien plus aisées que les anticorps monoclonaux [428]. Aucun scFv n'est actuellement disponible contre E. multilocularis, c'est pourquoi nous avons obtenu, auprès de l'équipe du Dr Philipp Kronenberg et Pr Peter Deplazes (Institute of Parasitology Zurich, Vetsuisse and Medical Faculty, University of Zurich), des hybridomes produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes AgB et Em18 d'E. multilocularis. L'antigène B est exprimé par les protoscolex et la couche germinale des métacestodes d'E. multilocularis [429], ce qui en fait une cible potentielle pour l'adressage. L'antigène Em18, une fraction de l'antigène EmII/3-10 extrait de protoscolex, est quant à lui utilisé à des fins diagnostiques, car ciblé par des IgG chez des patients souffrant d'EA active [27,430]. Ceci signifie que l'antigène est exposé au système immunitaire de l'homme, et donc a priori accessible à des nanoparticules administrées par voie systémique, ce qui en fait une cible d'adressage. Les ARNm de ces hybridomes ont été extraits et transmis à l'équipe du Pr Isabelle Dimier-Poisson, Dr Nicolas Aubrey et Dr Anne Di Tommaso (Immunologie Parasitaire et Vaccinologie Biothérapies Anti Infectieuses (IPVBTA), UMR Université-INRAE ISP 1282, Tours), spécialisée dans la conception de scFv à visée thérapeutique. La conception des scFv anti-AgB et anti-Em18 est actuellement en cours. En parallèle, nos collaborateurs de l'ISCR ont déjà mis au point et validé la technique de greffage du scFv aux nanoparticules de PLGA-PEG-COOH. Dans ce but, nous avons greffé un scFv déjà employé par l'ISP de Tours et bien caractérisé, dirigé contre l'antigène SAG1 de Toxoplasma gondii, un protozoaire apicomplexe. Le greffage était validé par ELISA anti-SAG1 (à partir d'extrait antigénique total de T. gondii), en utilisant les nanoparticules greffées comme anticorps primaire, et un anticorps secondaire anti-histidine (motif présent sur le scFv) couplé à l'HRP (HorseRadish Peroxydase). Un fort signal était observé avec les nanoparticules greffées et absent avec des nanoparticules non greffées. La même expérience a été répétée après conservation des nanoparticules à 37°C, mettant en évidence la stabilité de la liaison jusqu'à 2 mois après le greffage.

Enfin, si les nanoparticules PLGA-PEG-COOH contenant de la méfloquine, avec ou sans scFv, venaient à être inefficaces *in vivo*, nous pourrons aussi mettre au point d'autres formulations de nanoparticules, polymériques ou lipidiques, afin d'encapsuler les autres principes actifs candidats comme le niclosamide (dont nous faisons actuellement des essais de formulations en nanoparticules lipidiques), la MMV665807 ou l'atovaquone [417]. Il serait également possible d'imaginer la conception d'anticorps thérapeutiques destinés au traitement de l'EA, par exemple des scFv directement couplés à des agents actifs contre *E. multilocularis* ayant une faible CE₅₀ (par exemple BI 2536, bortézomib ou des *endochin-like* quinolones) [334,344,348].

REFERENCES

- [1] Li WX, Zhang D, Boyce K, Xi BW, Zou H, Wu SG, et al. The complete mitochondrial DNA of three monozoic tapeworms in the Caryophyllidea: a mitogenomic perspective on the phylogeny of eucestodes. Parasit Vectors 2017;10:314. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2245-y.
- [2] Kocot KM, Struck TH, Merkel J, Waits DS, Todt C, Brannock PM, et al. Phylogenomics of Lophotrochozoa with Consideration of Systematic Error. Syst Biol 2017;66:256–82. https://doi.org/10.1093/sysbio/syw079.
- [3] Knapp J, Gottstein B, Saarma U, Millon L. Taxonomy, phylogeny and molecular epidemiology of *Echinococcus multilocularis*: From fundamental knowledge to health ecology. Vet Parasitol 2015;213:85–91. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.030.
- [4] Vuitton DA, McManus DP, Rogan MT, Romig T, Gottstein B, Naidich A, et al. International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. Parasite 2020;27:41. https://doi.org/10.1051/parasite/2020024.
- [5] Cf F, Wu B, S Z-G, I M, S B, S G, et al. The golden jackal (*Canis aureus*): A new host for *Echinococcus multilocularis* and *Trichinella britovi* in Switzerland. Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde 2022;164. https://doi.org/10.17236/sat00338.
- [6] Schmidberger J, Uhlenbruck J, Schlingeloff P, Maksimov P, Conraths FJ, Mayer B, et al. Dog ownership and risk for alveolar echinococcosis, Germany. Emerg Infect Dis 2022;28:1597–605. https://doi.org/10.3201/eid2808.212514.
- [7] Pilarczyk BM, Tomza-Marciniak AK, Pilarczyk R, Rząd I, Bąkowska MJ, Udała JM, et al. Infection of raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from Northern Poland with gastrointestinal parasites as a potential threat to human health. J Clin Med 2022;11:1277. https://doi.org/10.3390/jcm11051277.
- [8] Huang F, Dang Z, Suzuki Y, Horiuchi T, Yagi K, Kouguchi H, et al. Analysis on gene expression profile in oncospheres and early stage metacestodes from *Echinococcus multilocularis*. PLoS Negl Trop Dis 2016;10:e0004634. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004634.
- [9] Veit P, Bilger B, Schad V, Schäfer J, Frank W, Lucius R. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. Parasitology 1995;110 (Pt 1):79–86. https://doi.org/10.1017/s0031182000081075.
- [10] Beerli O, Guerra D, Baltrunaite L, Deplazes P, Hegglin D. Microtus arvalis and Arvicola scherman: key players in the Echinococcus multilocularis life cycle. Front Vet Sci 2017;4:216. https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00216.
- [11] Świderski Z, Miquel J, Azzouz-Maache S, Pétavy A-F. Echinococcus multilocularis (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae): functional ultrastructure of the penetration glands and nerve cells within the oncosphere. Parasitol Res 2018;117:2653–63. https://doi.org/10.1007/s00436-018-5957-9.
- [12] Matsumoto J, Kouguchi H, Oku Y, Yagi K. Primary alveolar echinococcosis: course of larval development and antibody responses in intermediate host rodents with different genetic backgrounds after oral infection with eggs of *Echinococcus multilocularis*. Parasitol Int 2010;59:435–44. https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.06.003.
- [13] Lundström-Stadelmann B, Rufener R, Ritler D, Zurbriggen R, Hemphill A. The importance of being parasiticidal... an update on drug development for the treatment of alveolar echinococcosis. Food Waterborne Parasitol 2019;15:e00040. https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00040.

- [14] Torgerson PR, Keller K, Magnotta M, Ragland N. The global burden of alveolar echinococcosis. PLoS Negl Trop Dis 2010;4:e722. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000722.
- [15] Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, Torgerson PR, Harandi MF, Romig T, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis. Adv Parasitol 2017;95:315–493. https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.001.
- [16] Massolo A, Simoncini A, Romig T. The "bridge effect" by intermediate hosts may explain differential distributions of *Echinococcus* species. Trends Parasitol 2022;38:501–12. https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.04.003.
- [17] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, Li J, Vuitton DA, Zhang W, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century. Clin Microbiol Rev 2019;32:e00075-18. https://doi.org/10.1128/CMR.00075-18.
- [18] Centre national de référence Echinococcoses. Rapport annuel d'activité 2021. Années d'exercice 2019-2020. 2021.
- [19] Umhang G, Richomme C, Caillot C, Bastid V, Boucher J-M, Moyen J-L, et al. Towards delimitation of the *Echinococcus multilocularis* parasite's southernmost range in France. Vet Parasitol Reg Stud Reports 2022;30:100724. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100724.
- [20] Conraths FJ, Probst C, Possenti A, Boufana B, Saulle R, La Torre G, et al. Potential risk factors associated with human alveolar echinococcosis: Systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis 2017;11:e0005801. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005801.
- [21] Brunetti E, Kern P, Vuitton DA. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. Acta Tropica 2010;114:1–16. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.001.
- [22] Piarroux M, Piarroux R, Giorgi R, Knapp J, Bardonnet K, Sudre B, et al. Clinical features and evolution of alveolar echinococcosis in France from 1982 to 2007: results of a survey in 387 patients. J Hepatol 2011;55:1025–33. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.018.
- [23] Deibel A, Meyer zu Schwabedissen C, Husmann L, Grimm F, Deplazes P, Reiner CS, et al. Characteristics and clinical course of alveolar echinococcosis in patients with immunosuppression-associated conditions: a retrospective cohort study. Pathogens 2022;11:441. https://doi.org/10.3390/pathogens11040441.
- [24] Graeter T, Kratzer W, Oeztuerk S, Haenle MM, Mason RA, Hillenbrand A, et al. Proposal of a computed tomography classification for hepatic alveolar echinococcosis. World J Gastroenterol 2016;22:3621–31. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i13.3621.
- [25] Vuitton DA, Bresson-Hadni S, Chauchet A, Richou C, Grenouillet F, Delabrousse E, et al. L'échinococcose alvéolaire au XXIe siècle : une maladie infectieuse opportuniste ? Bull Acad Natl Med 2019;203:94–101. https://doi.org/10.1016/j.banm.2019.01.002.
- [26] Bresson-Hadni S, Blagosklonov O, Knapp J, Grenouillet F, Sako Y, Delabrousse E, et al. Should possible recurrence of disease contraindicate liver transplantation in patients with end-stage alveolar echinococcosis? A 20-year follow-up study. Liver Transpl 2011;17:855–65. https://doi.org/10.1002/lt.22299.
- [27] Gottstein B, Lachenmayer A, Beldi G, Wang J, Merkle B, Vu XL, et al. Diagnostic and follow-up performance of serological tests for different forms/courses of alveolar echinococcosis. Food Waterborne Parasitol 2019;16:e00055. https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00055.
- [28] Grüner B, Peters L, Hillenbrand A, Voßberg P, Schweiker J, Rollmann EG, et al. *Echinococcus multilocularis* specific antibody, systemic cytokine, and chemokine levels, as well as antigen-specific cellular responses in patients with progressive, stable, and cured alveolar

echinococcosis: A 10-year follow-up. PLoS Negl Trop Dis 2022;16:e0010099. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010099.

- [29] Haute Autorité de Santé. Argumentaire : actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des échinococcoses larvaires 2017. https://www.hassante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-07/dir152/argumentaire_echinococcoses.pdf (consulté le 25 Septembre 2022).
- [30] Reuter S, Jensen B, Buttenschoen K, Kratzer W, Kern P. Benzimidazoles in the treatment of alveolar echinococcosis: a comparative study and review of the literature. J Antimicrob Chemother 2000;46:451–6. https://doi.org/10.1093/jac/46.3.451.
- [31] Koch S, Bresson-Hadni S, Miguet J-P, Crumbach J-P, Gillet M, Mantion G-A, et al. Experience of liver transplantation for incurable alveolar echinococcosis: a 45-case European collaborative report. Transplantation 2003;75:856–63.

https://doi.org/10.1097/01.TP.0000054230.63568.79.

- [32] Liance M, Bresson-Hadni S, Meyer JP, Houin R, Vuitton DA. Cellular immunity in experimental *Echinococcus multilocularis* infection. I. Sequential and comparative study of specific in vivo delayed-type hypersensitivity against E. multilocularis antigens in resistant and sensitive mice. Clin Exp Immunol 1990;82:373–7. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb05456.x.
- [33] Woolsey ID, Jensen PM, Deplazes P, Kapel CMO. Peroral Echinococcus multilocularis egg inoculation in *Myodes glareolus*, *Mesocricetus auratus* and *Mus musculus* (CD-1 IGS and C57BL/6j). Int J Parasitol Parasites Wildl 2016;5:158–63. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.05.004.
- [34] Bauder, Auer, Schilcher, Gabler, Romig, Bilger, et al. Experimental investigations on the B and T cell immune response in primary alveolar echinococcosis. Parasit Immunol 1999;21:409–21. https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00241.x.
- [35] Emery I, Liance M, Leclerc C. Secondary *Echinococcus multilocularis* infection in A/J mice: delayed metacestode development is associated with Th1 cytokine production. Parasite Immunology 1997;19:493–503. https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1997.d01-162.x.
- [36] Federer K, Armua-Fernandez MT, Hoby S, Wenker C, Deplazes P. In vivo viability of Echinococcus multilocularis eggs in a rodent model after different thermo-treatments. Exp Parasitol 2015;154:14–9. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.03.016.
- [37] Yarahmadov T, Wang J, Sanchez-Taltavull D, Rojas CAA, Brodie T, Büchi I, et al. Primary infection by *E. multilocularis* induces distinct patterns of cross talk between hepatic natural killer T cells and regulatory T cells in mice. Infect Immun 2022;90:e0017422. https://doi.org/10.1128/iai.00174-22.
- [38] Gottstein B, Wittwer M, Schild M, Merli M, Leib SL, Müller N, et al. Hepatic gene expression profile in mice perorally infected with *Echinococcus multilocularis* eggs. PLoS One 2010;5:e9779. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009779.
- [39] Journal Officiel de la République Française. Arrêté du 16 novembre 2021 fixant la liste des agents biologiques pathogènes. 2021.
- [40] Liance M, Bresson-Hadni S, Vuitton DA, Lenys D, Carbillet JP, Houin R. Effects of cyclosporin A on the course of murine alveolar echinococcosis and on specific cellular and humoral immune responses against *Echinococcus multilocularis*. Int J Parasitol 1992;22:23–8. https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90075-v.
- [41] Wang J, Goepfert C, Mueller N, Piersigilli A, Lin R, Wen H, et al. Larval *Echinococcus multilocularis* infection reduces dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by

attenuating T helper type 1/type 17-mediated immune reactions. Immunology 2018;154:76–88. https://doi.org/10.1111/imm.12860.

- [42] Apaer S, Tuxun T, Ma H-Z, Zhang H, Zhang H, Payiziwula J, et al. Expression of toll-like receptor
 2, 4 and related cytokines in intraperitoneally inoculated Balb/C mice with *Echinococcus multilocularis*. Int J Clin Exp Pathol 2017;10:7947–55.
- [43] Dai WJ, Waldvogel A, Siles-Lucas M, Gottstein B. Echinococcus multilocularis proliferation in mice and respective parasite 14-3-3 gene expression is mainly controlled by an αβ+ CD4+ Tcell-mediated immune response. Immunology 2004;112:481–8. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01885.x.
- [44] Apaer S, Tuxun T, Zhang H, Aierken A, Li T, Zhao J-M, et al. Subcutaneous inoculation of *Echinococcus multilocularis* induces delayed regeneration after partial hepatectomy. Sci Rep 2019;9:462. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37293-0.
- [45] Liance M, Vuitton DA, Guerret-Stocker S, Carbillet JP, Grimaud JA, Houin R. Experimental alveolar echinococcosis. Suitability of a murine model of intrahepatic infection by *Echinococcus multilocularis* for immunological studies. Experientia 1984;40:1436–9. https://doi.org/10.1007/BF01951932.
- [46] Wang J, Lin R, Zhang W, Li L, Gottstein B, Blagosklonov O, et al. Transcriptional profiles of cytokine/chemokine factors of immune cell-homing to the parasitic lesions: a comprehensive one-year course study in the liver of *E. multilocularis*-infected mice. PLoS One 2014;9:e91638. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091638.
- [47] Wang H, Zhang C-S, Fang B-B, Hou J, Li W-D, Li Z-D, et al. Dual role of hepatic macrophages in the establishment of the *Echinococcus multilocularis* metacestode in mice. Front Immunol 2020;11:600635. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.600635.
- [48] Zhang C, Shao Y, Yang S, Bi X, Li L, Wang H, et al. T-cell tolerance and exhaustion in the clearance of Echinococcus multilocularis: role of inoculum size in a quantitative hepatic experimental model. Sci Rep 2017;7:11153. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11703-1.
- [49] Yang H-C, Zhang H-W, Yang J, Liu S-W, Zhang S-J. Autocrine osteopontin is involved in maintaining the growth and metastasis of *Echinococcus multilocularis*. Acta Trop 2022;228:106328. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106328.
- [50] Barth TFE, Casulli A. Morphological Characteristics of alveolar and cystic echinococcosis lesions in human liver and bone. Pathogens 2021;10:1326. https://doi.org/10.3390/pathogens10101326.
- [51] Hayashi N, Kouguchi H, Imasato Y, Irie T, Yagi K, Nonaka N, et al. Early-phase migration dynamics of *Echinococcus multilocularis* in two mouse strains showing different infection susceptibilities. Int J Parasitol 2021;51:893–8. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.04.001.
- [52] Joekel DE, Nur S, Monné Rodriguez J, Kronenberg PA, Kipar A, LeibundGut-Landmann S, et al. Agranulocytosis leads to intestinal *Echinococcus multilocularis* oncosphere invasion and hepatic metacestode development in naturally resistant Wistar rats. Parasitology 2021;148:53–62. https://doi.org/10.1017/S0031182020002012.
- [53] Joekel DE, Deplazes P. Optimized dexamethasone immunosuppression enables *Echinococcus multilocularis* liver establishment after oral egg inoculation in a rat model. Exp Parasitol 2017;180:27–32. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.003.
- [54] Armua-Fernandez MT, Joekel D, Schweiger A, Eichenberger RM, Matsumoto J, Deplazes P. Successful intestinal *Echinococcus multilocularis* oncosphere invasion and subsequent hepatic metacestode establishment in resistant RccHan[™]:WIST rats after pharmacological

immunosuppression. Parasitology 2016;143:1252–60. https://doi.org/10.1017/S0031182016000809.

- [55] Pater C, Müller V, Harraga S, Liance M, Godot V, Carbillet JP, et al. Intestinal and systemic humoral immunological events in the susceptible Balb/C mouse strain after oral administration of *Echinococcus multilocularis* eggs. Parasite Immunol 1998;20:623–9. https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00195.x.
- [56] Chauchet A, Grenouillet F, Knapp J, Richou C, Delabrousse E, Dentan C, et al. Increased incidence and characteristics of alveolar echinococcosis in patients with immunosuppressionassociated conditions. Clin Infect Dis 2014;59:1095–104. https://doi.org/10.1093/cid/ciu520.
- [57] Lachenmayer A, Gebbers D, Gottstein B, Candinas D, Beldi G. Elevated incidence of alveolar echinococcosis in immunocompromised patients. Food Waterborne Parasitol 2019;16:e00060. https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00060.
- [58] Cunningham-Rundles C, Maglione PJ. Common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol 2012;129:1425-1426.e3. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.025.
- [59] Hui W, Jiang S, Tang J, Hou H, Chen S, Jia B, et al. An immediate innate immune response occurred in the early stage of *E. granulosus* eggs infection in sheep: evidence from microarray analysis. PLoS One 2015;10:e0135096. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135096.
- [60] Mehlhorn H, Eckert J, Thompson RC. Proliferation and metastases formation of larval *Echinococcus multilocularis*. II. Ultrastructural investigations. Z Parasitenkd 1983;69:749–63. https://doi.org/10.1007/BF00927424.
- [61] Dai WJ, Hemphill A, Waldvogel A, Ingold K, Deplazes P, Mossmann H, et al. Major carbohydrate antigen of *Echinococcus multilocularis* induces an immunoglobulin G response independent of alphabeta+ CD4+ T cells. Infect Immun 2001;69:6074–83. https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6074-6083.2001.
- [62] Wang H, Zhang C-S, Fang B-B, Hou J, Li W-D, Li Z-D, et al. Dual role of hepatic macrophages in the establishment of the *Echinococcus multilocularis* metacestode in mice. Front Immunol 2020;11:600635. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.600635.
- [63] Dai WJ, Waldvogel A, Jungi T, Stettler M, Gottstein B. Inducible nitric oxide synthase deficiency in mice increases resistance to chronic infection with *Echinococcus multilocularis*. Immunology 2003;108:238–44. https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01567.x.
- [64] Dai WJ, Gottstein B. Nitric oxide-mediated immunosuppression following murine *Echinococcus* multilocularis infection. Immunology 1999;97:107–16. https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00723.x.
- [65] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol 2008;8:958–69. https://doi.org/10.1038/nri2448.
- [66] Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. Annu Rev Immunol 2010;28:445–89. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212.
- [67] Emery I, Leclerc C, Sengphommachanh K, Vuitton DA, Liance M. In vivo treatment with recombinant IL-12 protects C57BL/6J mice against secondary alveolar echinococcosis. Parasite Immunology 1998;20:81–91. https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00131.x.
- [68] Ma X, Zhang X, Liu J, Liu Y, Zhao C, Cai H, et al. The correlations between Th1 and Th2 cytokines in human alveolar echinococcosis. BMC Infect Dis 2020;20:414. https://doi.org/10.1186/s12879-020-05135-y.

- [69] Kilwinski J, Jenne L, Jellen-Ritter A, Radloff P, Flick W, Kern P. T lymphocyte cytokine profile at a single cell level in alveolar Echinococcosis. Cytokine 1999;11:373–81. https://doi.org/10.1006/cyto.1998.0432.
- [70] Mejri N, Müller J, Gottstein B. Intraperitoneal murine *Echinococcus multilocularis* infection induces differentiation of TGF-β-expressing DCs that remain immature. Parasite Immunol 2011;33:471–82. https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01303.x.
- [71] Godot V, Harraga S, Beurton I, Deschaseaux M, Sarciron E, Gottstein B, et al.
 Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. I. Comparison of patients with progressive and abortive lesions. Clin Exp Immunol 2000;121:484–90. https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01308.x.
- [72] Godot V, Harraga S, Beurton I, Tiberghien P, Sarciron E, Gottstein B, et al.
 Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. II. Influence of the HLA B8, DR3, DQ2 haplotype. Clin Exp Immunol 2000;121:491–8. https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01309.x.
- [73] Sturm D, Menzel J, Gottstein B, Kern P. Interleukin-5 is the predominant cytokine produced by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis. Infect Immun 1995;63:1688– 97. https://doi.org/10.1128/iai.63.5.1688-1697.1995.
- [74] Vuitton DA, Zhang SL, Yang Y, Godot V, Beurton I, Mantion G, et al. Survival strategy of *Echinococcus multilocularis* in the human host. Parasitology International 2006;55:S51–5. https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.11.007.
- [75] Emery I, Liance M, Deriaud E, Vuitton DA, Houin R, Leclerc C. Characterization of T-cell immune responses of *Echinococcus multilocularis*-infected C57BL/6J mice. Parasite Immunol 1996;18:463–72. https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1996.tb01030.x.
- [76] Hübner MP, Manfras BJ, Margos MC, Eiffler D, Hoffmann WH, Schulz-Key H, et al. Echinococcus multilocularis metacestodes modulate cellular cytokine and chemokine release by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis patients. Clin Exp Immunol 2006;145:243–51. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03142.x.
- [77] Margos MC, Grandgirard D, Leib S, Gottstein B. In vitro induction of lymph node cell proliferation by mouse bone marrow dendritic cells following stimulation with different *Echinococcus multilocularis* antigens. J Helminthol 2011;85:128–37. https://doi.org/10.1017/S0022149X10000878.
- [78] Bresson-Hadni S, Vuitton DA, Lenys D, Liance M, Racadot E, Miguet JP. Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. I. Lymphocyte reactivity to Echinococcus antigens in patients with alveolar echinococcosis. Clin Exp Immunol 1989;78:61– 6.
- [79] Alkarmi T, Behbehani K. *Echinococcus multilocularis*: inhibition of murine neutrophil and macrophage chemotaxis. Exp Parasitol 1989;69:16–22. https://doi.org/10.1016/0014-4894(89)90166-5.
- [80] Tian F, Jiang T, Qi X, Zhao Z, Li B, Aibibula M, et al. Role of cytokines on the progression of liver fibrosis in mice infected with *Echinococcus multilocularis*. Infect Drug Resist 2021;14:5651–60. https://doi.org/10.2147/IDR.S344508.
- [81] Ali-Khan Z. Cellular changes in the lymphoreticular tissues of C57L/J mice infected with *Echinococcus multilocularis* cysts. Immunology 1978;34:831–9.

- [82] Guerret S, Vuitton DA, Liance M, Pater C, Carbillet JP. *Echinococcus multilocularis*: relationship between susceptibility/resistance and liver fibrogenesis in experimental mice. Parasitol Res 1998;84:657–67. https://doi.org/10.1007/s004360050466.
- [83] Zhou Q, Yang X, Han H, Guo L, Jiang H, Wang X, et al. Correlation between angiogenesis and disease progression of hepatic *Echinococcus multilocularis* in C57BL/6 mice. Chinese J Parasitol Parasitic Dis 2019;37:302–10.
- [84] Yuan M, Song X, Lv W, Xin Q, Wang L, Gao Q, et al. Effect of anacardic acid against echinococcosis through inhibition of VEGF-induced angiogenesis. Vet Res 2019;50:3. https://doi.org/10.1186/s13567-019-0621-7.
- [85] Boubaker G, Strempel S, Hemphill A, Müller N, Wang J, Gottstein B, et al. Regulation of hepatic microRNAs in response to early stage *Echinococcus multilocularis* egg infection in C57BL/6 mice. PLoS Negl Trop Dis 2020;14:e0007640. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007640.
- [86] Song T, Li H, Yang L, Lei Y, Yao L, Wen H. Expression of hypoxia-inducible factor-1α in the infiltrative belt surrounding hepatic alveolar echinococcosis in rats. J Parasitol 2015;101:369– 73. https://doi.org/10.1645/14-685.1.
- [87] Krzywinska E, Kantari-Mimoun C, Kerdiles Y, Sobecki M, Isagawa T, Gotthardt D, et al. Loss of HIF-1α in natural killer cells inhibits tumour growth by stimulating non-productive angiogenesis. Nat Commun 2017;8:1597. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01599-w.
- [88] Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. Cell 2003;112:645–57. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00154-5.
- [89] Shevyrev D, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. Front Immunol 2020;10:3100. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03100.
- [90] Mejri N, Müller N, Hemphill A, Gottstein B. Intraperitoneal *Echinococcus multilocularis* infection in mice modulates peritoneal CD4+ and CD8+ regulatory T cell development. Parasitol Int 2011;60:45–53. https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.10.002.
- [91] Pang N, Zhang F, Ma X, Zhu Y, Zhao H, Xin Y, et al. TGF-β/Smad signaling pathway regulates Th17/Treg balance during *Echinococcus multilocularis* infection. Int Immunopharmacol 2014;20:248–57. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.038.
- [92] Wang J, Müller S, Lin R, Siffert M, Vuitton DA, Wen H, et al. Depletion of FoxP3+ Tregs improves control of larval *Echinococcus multilocularis* infection by promoting co-stimulation and Th1/17 immunity. Immun Inflamm Dis 2017;5:435–47. https://doi.org/10.1002/iid3.181.
- [93] Wang J, Cardoso R, Marreros N, Müller N, Lundström-Stadelmann B, Siffert M, et al. Foxp3+ T regulatory cells as a potential target for immunotherapy against primary infection with *Echinococcus multilocularis* eggs. Infect Immun 2018;86:e00542-18. https://doi.org/10.1128/IAI.00542-18.
- [94] Wang J, Vuitton DA, Müller N, Hemphill A, Spiliotis M, Blagosklonov O, et al. Deletion of Fibrinogen-like Protein 2 (FGL-2), a novel CD4+ CD25+ Treg effector molecule, leads to improved control of *Echinococcus multilocularis* infection in mice. PLoS Negl Trop Dis 2015;9:e0003755. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003755.
- [95] Ai G, Yan W, Yu H, Xiao F, Xi D, Ma K, et al. Soluble Fgl2 restricts autoimmune hepatitis progression via suppressing Tc17 and conventional CD8+ T cell function. J Gene Med 2018;20:e3023. https://doi.org/10.1002/jgm.3023.

- [96] Zeng M, Zeng K. Soluble fibrinogen-like protein 2 in condyloma acuminatum lesions. J Infect Dev Ctries 2020;14:589–96. https://doi.org/10.3855/jidc.12282.
- [97] Lin H, Chen R, Jiang X, Wu X, Huang X, Dong X, et al. Elevated fibrinogen-like protein 2 in TNBS-induced colitis mice: Association with Th17 and regulatory T cells. Mol Med Reports 2017;16:3445–54. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7005.
- [98] McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 family of cytokines in health and disease. Immunity 2019;50:892–906. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021.
- [99] McGinley AM, Sutton CE, Edwards SC, Leane CM, DeCourcey J, Teijeiro A, et al. Interleukin-17A serves a priming role in autoimmunity by recruiting IL-1β-producing myeloid cells that promote pathogenic T cells. Immunity 2020;52:342-356.e6. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.01.002.
- [100] Tuzlak S, Dejean AS, Iannacone M, Quintana FJ, Waisman A, Ginhoux F, et al. Repositioning TH cell polarization from single cytokines to complex help. Nat Immunol 2021;22:1210–7. https://doi.org/10.1038/s41590-021-01009-w.
- [101] Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. Annu Rev Pathol 2013;8:477–512. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130318.
- [102] Li B, Qi X, Liu Y, Yan Y, Shan J, Cai X, et al. Monocyte-derived macrophages: The supplements of hepatic macrophage in *Echinococcus multilocularis* infected mice. Immun Inflamm Dis 2022;10:e699. https://doi.org/10.1002/iid3.699.
- [103] Tuxun T, Apaer S, Ma H-Z, Zhao J-M, Lin R-Y, Aji T, et al. Plasma IL-23 and IL-5 as surrogate markers of lesion metabolic activity in patients with hepatic alveolar echinococcosis. Sci Rep 2018;8:4417. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20301-8.
- [104] Lechner CJ, Grüner B, Huang X, Hoffmann WH, Kern P, Soboslay PT. Parasite-specific IL-17type cytokine responses and soluble IL-17 receptor levels in Alveolar Echinococcosis patients. Clin Dev Immunol 2012;2012:735342. https://doi.org/10.1155/2012/735342.
- [105] Haskologlu S, Dogu F, Gollu Bahadır G, Akyuzluer S, Ciftci E, Altun D, et al. An Unexpected infection in loss-of-function mutations in STAT3: malignant alveolar echinococcosis in liver. Iran J Allergy Asthma Immunol 2020;19:667–75. https://doi.org/10.18502/ijaai.v19i6.4936.
- [106] Burkert S, Peters L, Bloehdorn J, Grüner B. Salvage therapy for alveolar echinococcosis-a case series. Pathogens 2022;11:333. https://doi.org/10.3390/pathogens11030333.
- [107] Reuter S, Buck A, Grebe O, Nüssle-Kügele K, Kern P, Manfras BJ. Salvage treatment with amphotericin B in progressive human alveolar echinococcosis. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:3586–91. https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3586-3591.2003.
- [108] Lanternier F, Cypowyj S, Picard C, Bustamante J, Lortholary O, Casanova J-L, et al. Primary immunodeficiencies underlying fungal infections. Curr Opin Pediatr 2013;25:736–47. https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000031.
- [109] Danion F, Aimanianda V, Bayry J, Duréault A, Wong SSW, Bougnoux M-E, et al. Aspergillus fumigatus infection in humans with STAT3-deficiency is associated with defective interferongamma and Th17 Responses. Front Immunol 2020;11:38. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00038.
- [110] Vuitton DA, Bresson-Hadni S, Laroche L, Kaiserlian D, Guerret-Stocker S, Bresson JL, et al. Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. II. Natural killer cell activity and cell subpopulations in the blood and in the periparasitic granuloma of patients with alveolar echinococcosis. Clin Exp Immunol 1989;78:67–74.

- [111] X B, Huang H, Gao S, Xu X. Echinococcus multilocularis induces surface high expression of inhibitory killer immunoglobulin-like receptor on natural killer cells. Allergol Immunopathol 2021;49:78–86. https://doi.org/10.15586/aei.v49i5.465.
- [112] Zhang S, Hüe S, Sène D, Penfornis A, Bresson-Hadni S, Kantelip B, et al. Expression of major histocompatibility complex class I chain-related molecule A, NKG2D, and transforming growth factor-beta in the liver of humans with alveolar echinococcosis: new actors in the tolerance to parasites? J Infect Dis 2008;197:1341–9. https://doi.org/10.1086/586709.
- [113] Zhang C, Wang H, Li J, Hou X, Li L, Wang W, et al. Involvement of TIGIT in natural killer cell exhaustion and immune escape in patients and mouse model with liver *Echinococcus multilocularis* infection. Hepatology 2021;74:3376–93. https://doi.org/10.1002/hep.32035.
- [114] Abulizi A, Shao Y, Aji T, Li Z, Zhang C, Aini A, et al. *Echinococcus multilocularis* inoculation induces NK cell functional decrease through high expression of NKG2A in C57BL/6 mice. BMC Infect Dis 2019;19:792. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4417-1.
- [115] Bellanger A-P, Courquet S, Pallandre J-R, Godet Y, Millon L. Echinococcus multilocularis vesicular fluid induces the expression of immune checkpoint proteins in vitro. Parasite Immunol 2020;42:e12711. https://doi.org/10.1111/pim.12711.
- [116] La X, Zhang F, Li Y, Li J, Guo Y, Zhao H, et al. Upregulation of PD-1 on CD4⁺CD25⁺ T cells is associated with immunosuppression in liver of mice infected with *Echinococcus multilocularis*. Int Immunopharmacol 2015;26:357–66. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.013.
- [117] Kalbasi A, Ribas A. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. Nat Rev Immunol 2020;20:25–39. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0218-4.
- [118] Jebbawi F, Bellanger A-P, Lunström-Stadelmann B, Rufener R, Dosch M, Goepfert C, et al. Innate and adaptive immune responses following PD-L1 blockade in treating chronic murine alveolar echinococcosis. Parasite Immunol 2021;43:e12834. https://doi.org/10.1111/pim.12834.
- [119] Wang J, Jebbawi F, Bellanger A-P, Beldi G, Millon L, Gottstein B. Immunotherapy of alveolar echinococcosis via PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade in mice. Parasite Immunol 2018;40:e12596. https://doi.org/10.1111/pim.12596.
- [120] Gottstein B, Wang J, Boubaker G, Marinova I, Spiliotis M, Müller N, et al. Susceptibility versus resistance in alveolar echinococcosis (larval infection with *Echinococcus multilocularis*). Vet Parasitol 2015;213:103–9. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.029.
- [121] Reuben JM, Tanner CE, Rau ME. Immunoprophylaxis with BCG of experimental *Echinococcus multilocularis* infections. Infect Immun 1978;21:135–9. https://doi.org/10.1128/iai.21.1.135-139.1978.
- [122] Reuben JM, Tanner CE. Protection against experimental echinococcosis by non-specifically stimulated peritoneal cells. Parasite Immunol 1983;5:61–6. https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1983.tb00723.x.
- [123] Amiot F, Vuong P, Defontaines M, Pater C, Dautry F, Liance M. Secondary alveolar echinococcosis in lymphotoxin-alpha and tumour necrosis factor-alpha deficient mice: exacerbation of *Echinococcus multilocularis* larval growth is associated with cellular changes in the periparasitic granuloma. Parasite Immunol 1999;21:475–83. https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00245.x.
- [124] Vuitton DA. The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? Acta Tropica 2003;85:119–32. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00230-9.

- [125] Sailer M, Soelder B, Allerberger F, Zaknun D, Feichtinger H, Gottstein B. Alveolar echinococcosis of the liver in a six-year-old girl with acquired immunodeficiency syndrome. J Pediatr 1997;130:320–3. https://doi.org/10.1016/s0022-3476(97)70364-0.
- [126] Geyer M, Wilpert J, Wiech T, Theilacker C, Stubanus M, Kramer-Zucker A, et al. Rapidly progressive hepatic alveolar echinococcosis in an ABO-incompatible renal transplant recipient. Transpl Infect Dis 2011;13:278–84. https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2010.00583.x.
- [127] Dupont C, Grenouillet F, Mabrut J-Y, Gay F, Persat F, Wallon M, et al. Fast-growing alveolar echinococcosis following lung transplantation. Pathogens 2020;9:E756. https://doi.org/10.3390/pathogens9090756.
- [128] Weiner SM, Krenn V, Koelbel C, Hoffmann HG, Hinkeldey K, Ockert D. Echinococcus multilocularis infection and TNF inhibitor treatment in a patient with rheumatoid arthritis. Rheumatol Int 2011;31:1399–400. https://doi.org/10.1007/s00296-010-1570-7.
- [129] Dentan C, Mazet R, Gilson M, Marchou-Lopez S, Gaudin P. Rheumatoid arthritis, alveolar echinococcosis, and rituximab: a case report. Joint Bone Spine 2012;79:325–7. https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2011.10.014.
- [130] Kocherscheidt L, Flakowski A-K, Grüner B, Hamm DM, Dietz K, Kern P, et al. Echinococcus multilocularis: inflammatory and regulatory chemokine responses in patients with progressive, stable and cured alveolar echinococcosis. Exp Parasitol 2008;119:467–74. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.006.
- [131] Huang X, Grüner B, Lechner CJ, Kern P, Soboslay PT. Distinctive cytokine, chemokine, and antibody responses in *Echinococcus multilocularis*-infected patients with cured, stable, or progressive disease. Med Microbiol Immunol 2014;203:185–93. https://doi.org/10.1007/s00430-014-0331-8.
- [132] Liance M, Ricard-Blum S, Emery I, Houin R, Vuitton DA. Echinococcus multilocularis infection in mice: in vivo treatment with a low dose of IFN-gamma decreases metacestode growth and liver fibrogenesis. Parasite 1998;5:231–7. https://doi.org/10.1051/parasite/1998053231.
- [133] Shi Y, Riese DJ, Shen J. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine axis in cancer. Frontiers in Pharmacology 2020;11.
- [134] Korbecki J, Kojder K, Simińska D, Bohatyrewicz R, Gutowska I, Chlubek D, et al. CC chemokines in a tumor: a review of pro-cancer and anti-cancer properties of the ligands of receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. Int J Mol Sci 2020;21:8412. https://doi.org/10.3390/ijms21218412.
- [135] Yoshie O, Matsushima K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. International Immunology 2015;27:11–20. https://doi.org/10.1093/intimm/dxu079.
- [136] Fei L, Ren X, Yu H, Zhan Y. Targeting the CCL2/CCR2 axis in cancer immunotherapy: one stone, three birds? Front Immunol 2021;12.
- [137] Bellanger A-P, Pallandre J-R, Gbaguidi-Haore H, Knapp J, Malézieux N, Lignon T, et al. Investigating the impact of *Echinococcus multilocularis* vesicular fluid on human cells from healthy blood donors. J Immunol Methods 2015;417:52–9. https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.12.006.
- [138] Bellanger A-P, Mougey V, Pallandre J-R, Gbaguidi-Haore H, Godet Y, Millon L. Echinococcus multilocularis vesicular fluid inhibits activation and proliferation of natural killer cells. Folia Parasitol 2017;64:2017.029. https://doi.org/10.14411/fp.2017.029.
- [139] Aumüller E, Schramm G, Gronow A, Brehm K, Gibbs BF, Doenhoff MJ, et al. *Echinococcus multilocularis* metacestode extract triggers human basophils to release interleukin-4. Parasite Immunol 2004;26:387–95. https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00724.x.
- [140] Mejri N, Gottstein B. Intraperitoneal *Echinococcus multilocularis* infection in C57BL/6 mice affects CD40 and B7 costimulator expression on peritoneal macrophages and impairs peritoneal T cell activation. Parasite Immunol 2006;28:373–85. https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00836.x.
- [141] Nono JK, Lutz MB, Brehm K. Expansion of host regulatory T Cells by secreted products of the tapeworm *Echinococcus multilocularis*. Front Immunol 2020;11:798. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00798.
- [142] Mejri N, Gottstein B. Echinococcus multilocularis metacestode metabolites contain a cysteine protease that digests eotaxin, a CC pro-inflammatory chemokine. Parasitol Res 2009;105:1253–60. https://doi.org/10.1007/s00436-009-1549-z.
- [143] Persat F, Vincent C, Schmitt D, Mojon M. Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferative response by glycosphingolipids from metacestodes of *Echinococcus multilocularis*. Infect Immun 1996;64:3682–7. https://doi.org/10.1128/iai.64.9.3682-3687.1996.
- [144] Nono JK, Lutz MB, Brehm K. EmTIP, a T-Cell immunomodulatory protein secreted by the tapeworm *Echinococcus multilocularis* is important for early metacestode development. PLoS Negl Trop Dis 2014;8:e2632. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002632.
- [145] Zhang T, Zhang Y, Yang Z, Jiang Y, Sun L, Huang D, et al. *Echinococcus multilocularis* protoscoleces enhance glycolysis to promote M2 Macrophages through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway. Pathog Glob Health 2022:1–8. https://doi.org/10.1080/20477724.2022.2104055.
- [146] Chong S, Chen G, Dang Z, Niu F, Zhang L, Ma H, et al. *Echinococcus multilocularis* drives the polarization of macrophages by regulating the RhoA-MAPK signaling pathway and thus affects liver fibrosis. Bioengineered 2022;13:8747–58. https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2056690.
- [147] Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen F-E, Jahnsen FL, Amalric F, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. Am J Pathol 2003;163:69–79. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63631-0.
- [148] Moussion C, Girard J-P. Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. Nature 2011;479:542–6. https://doi.org/10.1038/nature10540.
- [149] Girard J-P, Moussion C, Förster R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. Nat Rev Immunol 2012;12:762–73. https://doi.org/10.1038/nri3298.
- [150] Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. Immunol Rev 2018;281:154–68. https://doi.org/10.1111/imr.12619.
- [151] Rickard JA, O'Donnell JA, Evans JM, Lalaoui N, Poh AR, Rogers T, et al. RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. Cell 2014;157:1175–88. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.019.
- [152] Lefrançais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard J-P, et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. Proc Natl Acad Sci 2012;109:1673–8. https://doi.org/10.1073/pnas.1115884109.
- [153] Lefrançais E, Duval A, Mirey E, Roga S, Espinosa E, Cayrol C, et al. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:15502–7. https://doi.org/10.1073/pnas.1410700111.

- [154] Cayrol C, Duval A, Schmitt P, Roga S, Camus M, Stella A, et al. Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. Nat Immunol 2018;19:375–85. https://doi.org/10.1038/s41590-018-0067-5.
- [155] Travers J, Rochman M, Miracle CE, Habel JE, Brusilovsky M, Caldwell JM, et al. Chromatin regulates IL-33 release and extracellular cytokine activity. Nat Commun 2018;9:3244. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05485-x.
- [156] Gautier V, Cayrol C, Farache D, Roga S, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O, et al. Extracellular IL-33 cytokine, but not endogenous nuclear IL-33, regulates protein expression in endothelial cells. Sci Rep 2016;6:34255. https://doi.org/10.1038/srep34255.
- [157] Fux M, Pecaric-Petkovic T, Odermatt A, Hausmann OV, Lorentz A, Bischoff SC, et al. IL-33 is a mediator rather than a trigger of the acute allergic response in humans. Allergy 2014;69:216– 22. https://doi.org/10.1111/all.12309.
- [158] Gordon ED, Simpson LJ, Rios CL, Ringel L, Lachowicz-Scroggins ME, Peters MC, et al. Alternative splicing of interleukin-33 and type 2 inflammation in asthma. Proc Natl Acad Sci 2016;113:8765–70. https://doi.org/10.1073/pnas.1601914113.
- [159] Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A critical review of its biology and the mechanisms involved in its release as a potent extracellular cytokine. Cytokine 2022;156:155891. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155891.
- [160] Bessa J, Meyer CA, de Vera Mudry MC, Schlicht S, Smith SH, Iglesias A, et al. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. J Autoimmun 2014;55:33–41. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.02.012.
- [161] Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, et al. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel II-33-LacZ gene trap reporter strain. J Immunol 2012;188:3488–95. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101977.
- [162] Vainchtein ID, Chin G, Cho FS, Kelley KW, Miller JG, Chien EC, et al. Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development. Science 2018;359:1269–73. https://doi.org/10.1126/science.aal3589.
- [163] Gadani SP, Walsh JT, Smirnov I, Zheng J, Kipnis J. The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. Neuron 2015;85:703–9. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.013.
- [164] Hsu C-L, Bryce PJ. Inducible IL-33 expression by mast cells is regulated by a calcium-dependent pathway. J Immunol 2012;189:3421–9. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201224.
- [165] Chang Y-J, Kim HY, Albacker LA, Baumgarth N, McKenzie ANJ, Smith DE, et al. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. Nat Immunol 2011;12:631–8. https://doi.org/10.1038/ni.2045.
- [166] Hatzioannou A, Banos A, Sakelaropoulos T, Fedonidis C, Vidali M-S, Köhne M, et al. An intrinsic role of IL-33 in Treg cell-mediated tumor immunoevasion. Nat Immunol 2020;21:75–85. https://doi.org/10.1038/s41590-019-0555-2.
- [167] Wills-Karp M, Rani R, Dienger K, Lewkowich I, Fox JG, Perkins C, et al. Trefoil factor 2 rapidly induces interleukin 33 to promote type 2 immunity during allergic asthma and hookworm infection. J Exp Med 2012;209:607–22. https://doi.org/10.1084/jem.20110079.
- [168] Hoshino K, Kashiwamura S, Kuribayashi K, Kodama T, Tsujimura T, Nakanishi K, et al. The absence of interleukin 1 receptor-related T1/ST2 does not affect T helper cell type 2

development and its effector function. J Exp Med 1999;190:1541–8. https://doi.org/10.1084/jem.190.10.1541.

- [169] Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity 2005;23:479–90. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.09.015.
- [170] Demyanets S, Stojkovic S, Huber K, Wojta J. The paradigm change of IL-33 in vascular biology. Int J Mol Sci 2021;22:13288. https://doi.org/10.3390/ijms222413288.
- [171] Afferni C, Buccione C, Andreone S, Galdiero MR, Varricchi G, Marone G, et al. The pleiotropic immunomodulatory functions of IL-33 and its implications in tumor immunity. Front Immunol 2018;9:2601. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02601.
- [172] Chen S, Chen B, Wen Z, Huang Z, Ye L. IL-33/ST2-mediated inflammation in macrophages is directly abrogated by IL-10 during rheumatoid arthritis. Oncotarget 2017;8:32407–18. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16299.
- [173] Peng Y-Q, Chen D-H, Xu Z-B, Fang S-B, He B-X, Liu X-Q, et al. IL-33 receptor expression on myeloid and plasmacytoid dendritic cells after allergen challenge in patients with allergic rhinitis. Int Immunopharmacol 2021;101:108233. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108233.
- [174] Morimoto Y, Hirahara K, Kiuchi M, Wada T, Ichikawa T, Kanno T, et al. Amphiregulin-producing pathogenic memory T helper 2 cells instruct eosinophils to secrete osteopontin and facilitate airway fibrosis. Immunity 2018;49:134-150.e6. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.023.
- [175] Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. Blood 2009;113:1526–34. https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-157818.
- [176] Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. J Biol Chem 2007;282:26369–80. https://doi.org/10.1074/jbc.M704916200.
- [177] Zhang M, Duffen JL, Nocka KH, Kasaian MT. IL-13 Controls IL-33 activity through modulation of ST2. J Immunol 2021;207:3070–80. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100655.
- [178] Matsumoto K, Kouzaki H, Kikuoka H, Kato T, Tojima I, Shimizu S, et al. Soluble ST2 suppresses IL-5 production by human basophilic KU812 cells, induced by epithelial cell-derived IL-33. Allergol Int 2018;67S:S32–7. https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.05.009.
- [179] Iwahana H, Yanagisawa K, Ito-Kosaka A, Kuroiwa K, Tago K, Komatsu N, et al. Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. Eur J Biochem 1999;264:397–406. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00615.x.
- [180] Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. EMBO J 1994;13:1176–88. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06367.x.
- [181] Mildner M, Storka A, Lichtenauer M, Mlitz V, Ghannadan M, Hoetzenecker K, et al. Primary sources and immunological prerequisites for sST2 secretion in humans. Cardiovasc Res 2010;87:769–77. https://doi.org/10.1093/cvr/cvq104.

- [182] Pusceddu I, Dieplinger B, Mueller T. ST2 and the ST2/IL-33 signalling pathway–biochemistry and pathophysiology in animal models and humans. Clin Chim Acta 2019;495:493–500. https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.05.023.
- [183] Meisel C, Bonhagen K, Löhning M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Radbruch A, et al. Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. J Immunol 2001;166:3143–50. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.5.3143.
- [184] Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. Proc Natl Acad Sci 1998;95:6930–5. https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6930.
- [185] Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, et al. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. Nat Immunol 2004;5:1157–65. https://doi.org/10.1038/ni1128.
- [186] Yamashita M, Ukai-Tadenuma M, Miyamoto T, Sugaya K, Hosokawa H, Hasegawa A, et al. Essential role of GATA3 for the maintenance of type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci. J Biol Chem 2004;279:26983–90. https://doi.org/10.1074/jbc.M403688200.
- [187] Pai S-Y, Truitt ML, Ho I-C. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. Proc Natl Acad Sci 2004;101:1993–8. https://doi.org/10.1073/pnas.0308697100.
- [188] Smithgall MD, Comeau MR, Yoon B-RP, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. Int Immunol 2008;20:1019–30. https://doi.org/10.1093/intimm/dxn060.
- [189] Guo L, Wei G, Zhu J, Liao W, Leonard WJ, Zhao K, et al. IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. Proc Natl Acad Sci 2009;106:13463–8. https://doi.org/10.1073/pnas.0906988106.
- [190] Kobayashi T, Iijima K, Checkel JL, Kita H. IL-1 family cytokines drive Th2 and Th17 cells to innocuous airborne antigens. Am J Respir Cell Mol Biol 2013;49:989–98. https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0444OC.
- [191] Blom L, Poulsen BC, Jensen BM, Hansen A, Poulsen LK. IL-33 induces IL-9 production in human CD4+ T cells and basophils. PLoS One 2011;6:e21695. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021695.
- [192] Angkasekwinai P, Dong C. IL-9-producing T cells: potential players in allergy and cancer. Nat Rev Immunol 2021;21:37–48. https://doi.org/10.1038/s41577-020-0396-0.
- [193] Endo Y, Hirahara K, Iinuma T, Shinoda K, Tumes DJ, Asou HK, et al. The interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in the airway. Immunity 2015;42:294–308. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.016.
- [194] Obata-Ninomiya K, Ishiwata K, Nakano H, Endo Y, Ichikawa T, Onodera A, et al. CXCR6+ST2+ memory T helper 2 cells induced the expression of major basic protein in eosinophils to reduce the fecundity of helminth. Proc Natl Acad Sci 2018;115:E9849–58. https://doi.org/10.1073/pnas.1714731115.

- [195] Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. Annu Rev Immunol 2012;30:531–64. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.
- [196] Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3+ regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer. Immunity 2019;50:302–16. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.020.
- [197] Cretney E, Kallies A, Nutt SL. Differentiation and function of Foxp3+ effector regulatory T cells. Trends Immunol 2013;34:74–80. https://doi.org/10.1016/j.it.2012.11.002.
- [198] Levine AG, Mendoza A, Hemmers S, Moltedo B, Niec RE, Schizas M, et al. Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. Nature 2017;546:421–5. https://doi.org/10.1038/nature22360.
- [199] Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al. CD4+ Regulatory T Cells Control TH17 Responses in a Stat3-Dependent Manner. Science 2009;326:986–91. https://doi.org/10.1126/science.1172702.
- [200] Ohnmacht C, Park J-H, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, et al. The microbiota regulates type 2 immunity through RORγt+ T cells. Science 2015;349:989–93. https://doi.org/10.1126/science.aac4263.
- [201] Yang B-H, Hagemann S, Mamareli P, Lauer U, Hoffmann U, Beckstette M, et al. Foxp3+ T cells expressing RORγt represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. Mucosal Immunol 2016;9:444–57. https://doi.org/10.1038/mi.2015.74.
- [202] Ogawa C, Bankoti R, Nguyen T, Hassanzadeh-Kiabi N, Nadeau S, Porritt RA, et al. Blimp-1 functions as a molecular switch to prevent inflammatory activity in Foxp3+RORγt+ regulatory T cells. Cell Rep 2018;25:19-28.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.016.
- [203] Downs-Canner S, Berkey S, Delgoffe GM, Edwards RP, Curiel T, Odunsi K, et al. Suppressive IL-17A+Foxp3+ and ex-Th17 IL-17AnegFoxp3+ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. Nat Commun 2017;8:14649. https://doi.org/10.1038/ncomms14649.
- [204] Siede J, Fröhlich A, Datsi A, Hegazy AN, Varga DV, Holecska V, et al. IL-33 Receptor-Expressing Regulatory T Cells Are Highly Activated, Th2 Biased and Suppress CD4 T Cell Proliferation through IL-10 and TGFβ Release. PLoS One 2016;11:e0161507. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161507.
- [205] Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelmann K, Wohlfert EA, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. Nature 2014;513:564–8. https://doi.org/10.1038/nature13577.
- [206] Son J, Cho J-W, Park HJ, Moon J, Park S, Lee H, et al. Tumor-infiltrating regulatory T-cell accumulation in the tumor microenvironment is mediated by IL33/ST2 signaling. Cancer Immunol Res 2020;8:1393–406. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0828.
- [207] Kolodin D, van Panhuys N, Li C, Magnuson AM, Cipolletta D, Miller CM, et al. Antigen- and cytokine-driven accumulation of regulatory T cells in visceral adipose tissue of lean mice. Cell Metab 2015;21:543–57. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.03.005.
- [208] Andreas N, Weber F, Meininger I, Templin N, Gaestel M, Kamradt T, et al. IL-33-activated murine mast cells control the dichotomy between RORγt+ and Helios+ Tregs via the MK2/3mediated IL-6 production in vitro. Eur J Immunol 2019;49:2159–71. https://doi.org/10.1002/eji.201948154.

- [209] Kawai K, Uchiyama M, Hester J, Issa F. IL-33 drives the production of mouse regulatory T cells with enhanced in vivo suppressive activity in skin transplantation. Am J Transplant 2021;21:978–92. https://doi.org/10.1111/ajt.16266.
- [210] Ngo Thi Phuong N, Palmieri V, Adamczyk A, Klopfleisch R, Langhorst J, Hansen W, et al. IL-33 drives expansion of type 2 innate lymphoid cells and regulatory T cells and protects mice from severe, acute colitis. Front Immunol 2021;12:669787. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669787.
- [211] Guo S, Luo Y. Brain Foxp3+ regulatory T cells can be expanded by Interleukin-33 in mouse ischemic stroke. Int Immunopharmacol 2020;81:106027. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106027.
- [212] Faustino LD, Griffith JW, Rahimi RA, Nepal K, Hamilos DL, Cho JL, et al. Interleukin-33 activates regulatory T cells to suppress innate γδ T cell responses in the lung. Nat Immunol 2020;21:1371–83. https://doi.org/10.1038/s41590-020-0785-3.
- [213] Pastille E, Wasmer M-H, Adamczyk A, Vu VP, Mager LF, Phuong NNT, et al. The IL-33/ST2 pathway shapes the regulatory T cell phenotype to promote intestinal cancer. Mucosal Immunol 2019;12:990–1003. https://doi.org/10.1038/s41385-019-0176-y.
- [214] Tan W, Zhang B, Liu X, Zhang C, Liu J, Miao Q. Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells Mediates Pulmonary Epithelial Regeneration During Acute Respiratory Distress Syndrome. Front Immunol 2021;12:653803. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.653803.
- [215] Nascimento DC, Melo PH, Piñeros AR, Ferreira RG, Colón DF, Donate PB, et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. Nat Commun 2017;8:14919. https://doi.org/10.1038/ncomms14919.
- [216] Molofsky AB, Van Gool F, Liang H-E, Van Dyken SJ, Nussbaum JC, Lee J, et al. Interleukin-33 and Interferon-γ Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. Immunity 2015;43:161–74. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.019.
- [217] Arpaia N, Green JA, Moltedo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. Cell 2015;162:1078–89. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.021.
- [218] Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. Cell 2018;174:1054–66. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017.
- [219] Guia S, Narni-Mancinelli E. Helper-like Innate Lymphoid Cells in Humans and Mice. Trends Immunol 2020;41:436–52. https://doi.org/10.1016/j.it.2020.03.002.
- [220] McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, et al. Interleukin-33dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. Immunity 2013;39:357–71. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.018.
- [221] Long A, Dominguez D, Qin L, Chen S, Fan J, Zhang M, et al. Type 2 innate lymphoid cells impede IL-33-mediated tumor suppression. J Immunol 2018;201:3456–64. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800173.
- [222] Dahlgren MW, Jones SW, Cautivo KM, Dubinin A, Ortiz-Carpena JF, Farhat S, et al. Adventitial stromal cells define group 2 innate lymphoid cell tissue niches. Immunity 2019;50:707-722.e6. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.02.002.
- [223] Dahlgren MW, Molofsky AB. Adventitial cuffs: regional hubs for tissue immunity. Trends Immunol 2019;40:877–87. https://doi.org/10.1016/j.it.2019.08.002.

- [224] Surace L, Doisne J-M, Croft CA, Thaller A, Escoll P, Marie S, et al. Dichotomous metabolic networks govern human ILC2 proliferation and function. Nat Immunol 2021;22:1367–74. https://doi.org/10.1038/s41590-021-01043-8.
- [225] Li Q, Li D, Zhang X, Wan Q, Zhang W, Zheng M, et al. E3 Ligase VHL Promotes Group 2 Innate Lymphoid Cell Maturation and Function via Glycolysis Inhibition and Induction of Interleukin-33 Receptor. Immunity 2018;48:258-270.e5. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.12.013.
- [226] Kearley J, Silver JS, Sanden C, Liu Z, Berlin AA, White N, et al. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. Immunity 2015;42:566–79. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.011.
- [227] Caslin HL, Kiwanuka KN, Haque TT, Taruselli MT, MacKnight HP, Paranjape A, et al. Controlling mast cell activation and homeostasis: work influenced by Bill Paul that continues today. Front Immunol 2018;9.
- [228] Akin C. Mast cell activation syndromes. J Allergol Clin Immunol 2017;140:349–55. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.06.007.
- [229] Ho LH, Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Suto H, Iikura M, et al. IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcepsilonRI signals. J Leukoc Biol 2007;82:1481–90. https://doi.org/10.1189/jlb.0407200.
- [230] Moulin D, Donzé O, Talabot-Ayer D, Mézin F, Palmer G, Gabay C. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. Cytokine 2007;40:216–25. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.09.013.
- [231] Finlay CM, Cunningham KT, Doyle B, Mills KHG. IL-33-stimulated murine mast cells polarize alternatively activated macrophages, which suppress T Cells that mediate experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2020;205:1909–19. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901321.
- [232] Eissmann MF, Dijkstra C, Jarnicki A, Phesse T, Brunnberg J, Poh AR, et al. IL-33-mediated mast cell activation promotes gastric cancer through macrophage mobilization. Nat Commun 2019;10:2735. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10676-1.
- [233] Drube S, Müller S, Weber F, Wegner P, Böttcher-Loschinski R, Gaestel M, et al. IL-3 is essential for ICOS-L stabilization on mast cells, and sustains the IL-33-induced RORγt+ Treg generation via enhanced IL-6 induction. Immunology 2021;163:86–97. https://doi.org/10.1111/imm.13305.
- [234] Agier J, Brzezińska-Błaszczyk E, Różalska S, Wiktorska M, Kozłowska E, Żelechowska P. Mast cell phenotypic plasticity and their activity under the influence of cathelicidin-related antimicrobial peptide (CRAMP) and IL-33 alarmins. Cell Immunol 2021;369:104424. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104424.
- [235] Numata T, Ito T, Maeda T, Egusa C, Tsuboi R. IL-33 promotes ICAM-1 expression via NF-kB in murine mast cells. Allergol Int 2016;65:158–65. https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.10.004.
- [236] He R, Yin H, Yuan B, Liu T, Luo L, Huang P, et al. IL-33 improves wound healing through enhanced M2 macrophage polarization in diabetic mice. Mol Immunol 2017;90:42–9. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.06.249.
- [237] Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, et al. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. J Immunol 2009;183:6469–77. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901575.

- [238] Li D, Guabiraba R, Besnard A-G, Komai-Koma M, Jabir MS, Zhang L, et al. IL-33 promotes ST2dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. J Allergy Clin Immunol 2014;134:1422-1432.e11. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.05.011.
- [239] Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, et al. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. Circ Res 2010;107:650–8. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.218867.
- [240] Tu L, Chen J, Xu D, Xie Z, Yu B, Tao Y, et al. IL-33-induced alternatively activated macrophage attenuates the development of TNBS-induced colitis. Oncotarget 2017;8:27704–14. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15984.
- [241] Wang C, Dong C, Xiong S. IL-33 enhances macrophage M2 polarization and protects mice from CVB3-induced viral myocarditis. J Mol Cell Cardiol 2017;103:22–30. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.12.010.
- [242] Dagher R, Copenhaver AM, Besnard V, Berlin A, Hamidi F, Maret M, et al. IL-33-ST2 axis regulates myeloid cell differentiation and activation enabling effective club cell regeneration. Nat Commun 2020;11:4786. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18466-w.
- [243] Varricchi G, Poto R, Marone G, Schroeder JT. IL-3 in the development and function of basophils. Semin Immunol 2021;54:101510. https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101510.
- [244] Gambardella AR, Poto R, Tirelli V, Schroeder JT, Marone G, Mattei F, et al. Differential effects of alarmins on human and mouse basophils. Front Immunol 2022;13:894163. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.894163.
- [245] Schroeder JT, Bieneman AP. Activation of human basophils by A549 lung epithelial cells reveals a novel IgE-dependent response independent of allergen. J Immunol 2017;199:855– 65. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700055.
- [246] Salter BM, Oliveria JP, Nusca G, Smith SG, Tworek D, Mitchell PD, et al. IL-25 and IL-33 induce Type 2 inflammation in basophils from subjects with allergic asthma. Respir Res 2016;17:5. https://doi.org/10.1186/s12931-016-0321-z.
- [247] Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, Nagase H, Tamura C, Komiya A, et al. An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. J Immunol 2008;181:5981–9. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.5981.
- [248] Marwaha AK, Laxer R, Liang M, Muise AM, Eiwegger T, IMMUNE DYSREGULATION GROUP. A chromosomal duplication encompassing interleukin-33 causes a novel hyper IgE phenotype characterized by eosinophilic esophagitis and generalized autoimmunity. Gastroenterology 2022;163:510-513.e3. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.04.026.
- [249] Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. J Allergy Clin Immunol 2008;121:1484–90. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.04.005.
- [250] Uchida AM, Lenehan PJ, Vimalathas P, Miller KC, Valencia-Yang M, Qiang L, et al. Tissue eosinophils express the IL-33 receptor ST2 and type 2 cytokines in patients with eosinophilic esophagitis. Allergy 2022;77:656–60. https://doi.org/10.1111/all.15127.
- [251] Al-Shaikhly T, Murphy RC, Parker A, Lai Y, Altman MC, Larmore M, et al. Location of eosinophils in the airway wall is critical for specific features of airway hyperresponsiveness and T2 inflammation in asthma. Eur Respir J 2022;60:2101865. https://doi.org/10.1183/13993003.01865-2021.

- [252] de Oliveira VG, Rodrigues VF, Moreira JMP, Rodrigues JL, Maggi L, Resende SD, et al. Eosinophils participate in modulation of liver immune response and tissue damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. Cytokine 2022;149:155701. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155701.
- [253] Westermann S, Dietschmann A, Doehler D, Castiglione K, Bochner BS, Voehringer D, et al. Siglec-F promotes IL-33-induced cytokine release from bone marrow-derived eosinophils independently of the ITIM and ITIM-like motif phosphorylation. J Immunol 2022;208:732–44. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100184.
- [254] Xu L, Yang Y, Wen Y, Jeong J-M, Emontzpohl C, Atkins CL, et al. Hepatic recruitment of eosinophils and their protective function during acute liver injury. J Hepatol 2022;77:344–52. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.02.024.
- [255] Uchida AM, Ro G, Qiang L, Peterson KA, Round J, Dougan M, et al. Human differentiated eosinophils release IL-13 in response to IL-33 stimulation. Front Immunol 2022;13:946643. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.946643.
- [256] Larsen KM, Minaya MK, Vaish V, Peña MMO. The Role of IL-33/ST2 Pathway in Tumorigenesis. Int J Mol Sci 2018;19:E2676. https://doi.org/10.3390/ijms19092676.
- [257] Alonso-Curbelo D, Ho Y-J, Burdziak C, Maag JLV, Morris JP, Chandwani R, et al. A geneenvironment-induced epigenetic program initiates tumorigenesis. Nature 2021;590:642–8. https://doi.org/10.1038/s41586-020-03147-x.
- [258] De Boeck A, Ahn BY, D'Mello C, Lun X, Menon SV, Alshehri MM, et al. Glioma-derived IL-33 orchestrates an inflammatory brain tumor microenvironment that accelerates glioma progression. Nat Commun 2020;11:4997. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18569-4.
- [259] Ercolano G, Gomez-Cadena A, Dumauthioz N, Vanoni G, Kreutzfeldt M, Wyss T, et al. PPARy drives IL-33-dependent ILC2 pro-tumoral functions. Nat Commun 2021;12:2538. https://doi.org/10.1038/s41467-021-22764-2.
- [260] Halvorsen EC, Franks SE, Wadsworth BJ, Harbourne BT, Cederberg RA, Steer CA, et al. IL-33 increases ST2+ Tregs and promotes metastatic tumour growth in the lungs in an amphiregulindependent manner. Oncolmmunology 2019;8:e1527497. https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1527497.
- [261] Li A, Herbst RH, Canner D, Schenkel JM, Smith OC, Kim JY, et al. IL-33 signaling alters regulatory T cell diversity in support of tumor development. Cell Rep 2019;29:2998-3008.e8. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.120.
- [262] Alam A, Levanduski E, Denz P, Villavicencio HS, Bhatta M, Alhorebi L, et al. Fungal mycobiome drives IL-33 secretion and type 2 immunity in pancreatic cancer. Cancer Cell 2022;40:153-167.e11. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.01.003.
- [263] Akimoto M, Maruyama R, Takamaru H, Ochiya T, Takenaga K. Soluble IL-33 receptor sST2 inhibits colorectal cancer malignant growth by modifying the tumour microenvironment. Nat Commun 2016;7:13589. https://doi.org/10.1038/ncomms13589.
- [264] Tran CP, Scurr M, O'Connor L, Buzzelli JN, Ng GZ, Chin SCN, et al. IL-33 promotes gastric tumour growth in concert with activation and recruitment of inflammatory myeloid cells. Oncotarget 2022;13:785–99. https://doi.org/10.18632/oncotarget.28238.
- [265] Zhang Y, Davis C, Shah S, Hughes D, Ryan JC, Altomare D, et al. IL-33 promotes growth and liver metastasis of colorectal cancer in mice by remodeling the tumor microenvironment and inducing angiogenesis. Mol Carcinog 2017;56:272–87. https://doi.org/10.1002/mc.22491.

- [266] Jiang W, Lian J, Yue Y, Zhang Y. IL-33/ST2 as a potential target for tumor immunotherapy. Eur J Immunol 2021;51:1943–55. https://doi.org/10.1002/eji.202149175.
- [267] Yang K, Tian C, Zhang C, Xiang M. The controversial role of IL-33 in lung cancer. Front Immunol 2022;13:897356. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.897356.
- [268] Kawakami T, Blank U. Editorial overview: Recent advances in research of IgE-mediated and IgE-independent allergies, an overview. Current Opin Immunol 2021;72:vi–viii. https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.10.003.
- [269] Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. Nat Immunol 2015;16:45–56. https://doi.org/10.1038/ni.3049.
- [270] Takatori H, Makita S, Ito T, Matsuki A, Nakajima H. Regulatory mechanisms of IL-33-ST2mediated allergic inflammation. Front Immunol 2018;9:2004. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02004.
- [271] Badi YE, Salcman B, Taylor A, Rana B, Kermani NZ, Riley JH, et al. IL1RAP expression and the enrichment of IL-33 activation signatures in severe neutrophilic asthma. Allergy 2022. https://doi.org/10.1111/all.15487.
- [272] Saluja R, Ketelaar ME, Hawro T, Church MK, Maurer M, Nawijn MC. The role of the IL-33/IL-1RL1 axis in mast cell and basophil activation in allergic disorders. Mol Immunol 2015;63:80–5. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.06.018.
- [273] Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. Proc Natl Acad Sci 2010;107:18581–6. https://doi.org/10.1073/pnas.1003059107.
- [274] Robb CT, Zhou Y, Felton JM, Zhang B, Goepp M, Jheeta P, et al. Metabolic regulation by prostaglandin E2 impairs lung group 2 innate lymphoid cell responses. Allergy 2022. https://doi.org/10.1111/all.15541.
- [275] Christianson CA, Goplen NP, Zafar I, Irvin C, Good JT, Rollins DR, et al. Persistence of asthma requires multiple feedback circuits involving type 2 innate lymphoid cells and IL-33. J Allergy Clin Immunol 2015;136:59-68.e14. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.037.
- [276] Matsuyama T, Matsuyama H, Dotake Y, Takagi K, Machida K, Inoue H. The therapeutic potential for targeting group 2 innate lymphoid cells in asthma. Front Immunol 2022;13:930862. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.930862.
- [277] Saikumar Jayalatha AK, Hesse L, Ketelaar ME, Koppelman GH, Nawijn MC. The central role of IL-33/IL-1RL1 pathway in asthma: From pathogenesis to intervention. Pharmacol Ther 2021;225:107847. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107847.
- [278] Maurer M, Cheung DS, Theess W, Yang X, Dolton M, Guttman A, et al. Phase 2 randomized clinical trial of astegolimab in patients with moderate to severe atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 2022. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.08.015.
- [279] Kelsen SG, Agache IO, Soong W, Israel E, Chupp GL, Cheung DS, et al. Astegolimab (anti-ST2) efficacy and safety in adults with severe asthma: A randomized clinical trial. J Allergy Clin Immunol 2021;148:790–8. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.03.044.
- [280] Wechsler ME, Ruddy MK, Pavord ID, Israel E, Rabe KF, Ford LB, et al. Efficacy and safety of itepekimab in patients with moderate-to-severe asthma. N Engl J Med 2021;385:1656–68. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024257.
- [281] Shakerian L, Kolahdooz H, Garousi M, Keyvani V, Kamal Kheder R, Abdulsattar Faraj T, et al. IL-33/ST2 axis in autoimmune disease. Cytokine 2022;158:156015. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.156015.

- [282] Dong Y, Zhong J, Dong L. IL-33 in rheumatic diseases. Front Med 2021;8:739489. https://doi.org/10.3389/fmed.2021.739489.
- [283] Wang X, Zhu YF, Li DM, Qin Q, Wang Q, Muhali FS, et al. Polymorphisms of ST2-IL18R1-IL18RAP gene cluster: a new risk for autoimmune thyroid diseases. Int J Immunogenet 2016;43:18–24. https://doi.org/10.1111/iji.12240.
- [284] Iwaszko M, Wielińska J, Świerkot J, Kolossa K, Sokolik R, Bugaj B, et al. IL-33 gene polymorphisms as potential biomarkers of disease susceptibility and response to TNF inhibitors in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and psoriatic arthritis patients. Front Immunol 2021;12:631603. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631603.
- [285] Rostan O, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Robert-Gangneux F, Gangneux J-P, Samson M. Crucial and diverse role of the interleukin-33/ST2 axis in infectious diseases. Infect Immun 2015;83:1738–48. https://doi.org/10.1128/IAI.02908-14.
- [286] Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grencis RK. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. J Immunol 2008;180:2443–9. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2443.
- [287] Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, et al. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematodeinfected mice. Proc Natl Acad Sci 2012;109:3451–6. https://doi.org/10.1073/pnas.1201042109.
- [288] Hung L-Y, Lewkowich IP, Dawson LA, Downey J, Yang Y, Smith DE, et al. IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical Type 2 immunity against hookworms. Proc Natl Acad Sci 2013;110:282–7. https://doi.org/10.1073/pnas.1206587110.
- [289] Meiners J, Reitz M, Rüdiger N, Turner J-E, Heepmann L, Rudolf L, et al. IL-33 facilitates rapid expulsion of the parasitic nematode *Strongyloides ratti* from the intestine via ILC2- and IL-9driven mast cell activation. PLoS Pathog 2020;16:e1009121. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009121.
- [290] Bouchery T, Kyle R, Camberis M, Shepherd A, Filbey K, Smith A, et al. ILC2s and T cells cooperate to ensure maintenance of M2 macrophages for lung immunity against hookworms. Nat Commun 2015;6:6970. https://doi.org/10.1038/ncomms7970.
- [291] Chen Z, Luo J, Li J, Kim G, Stewart A, Urban JF, et al. Interleukin-33 promotes serotonin release from enterochromaffin cells for intestinal homeostasis. Immunity 2021;54:151-163.e6. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.014.
- [292] Johnston CJC, Smyth DJ, Kodali RB, White MPJ, Harcus Y, Filbey KJ, et al. A structurally distinct TGF-β mimic from an intestinal helminth parasite potently induces regulatory T cells. Nat Commun 2017;8:1741. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01886-6.
- [293] Osbourn M, Soares DC, Vacca F, Cohen ES, Scott IC, Gregory WF, et al. HpARI protein secreted by a helminth parasite suppresses interleukin-33. Immunity 2017;47:739-751.e5. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.09.015.
- [294] Yamagishi R, Kamachi F, Nakamura M, Yamazaki S, Kamiya T, Takasugi M, et al. Gasdermin Dmediated release of IL-33 from senescent hepatic stellate cells promotes obesity-associated hepatocellular carcinoma. Sci Immunol 2022;7:eabl7209. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abl7209.
- [295] Zhao M, Ren K, Xiong X, Xin Y, Zou Y, Maynard JC, et al. Epithelial STAT6 O-GlcNAcylation drives a concerted anti-helminth alarmin response dependent on tuft cell hyperplasia and Gasdermin C. Immunity 2022;55:623-638.e5. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.03.009.

- [296] Chen W, Chen S, Yan C, Zhang Y, Zhang R, Chen M, et al. Allergen protease-activated stress granule assembly and gasdermin D fragmentation control interleukin-33 secretion. Nat Immunol 2022;23:1021–30. https://doi.org/10.1038/s41590-022-01255-6.
- [297] Peng H, Sun R, Zhang Q, Zhao J, Wei J, Zeng X, et al. Interleukin 33 mediates type 2 immunity and inflammation in the central nervous system of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. J Infect Dis 2013;207:860–9. https://doi.org/10.1093/infdis/jis682.
- [298] Du W-Y, Chen C-W, Lin F-K, Chuang C-C. IL-33 mediates the expressions of IL-5 and IL-13 in Angiostrongylus cantonensis-infected mice. Exp Parasitol 2013;135:587–94. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.09.012.
- [299] Leal-Silva T, Vieira-Santos F, Oliveira FMS, Padrão L de LS, Kraemer L, da Paixão Matias PH, et al. Detrimental role of IL-33/ST2 pathway sustaining a chronic eosinophil-dependent Th2 inflammatory response, tissue damage and parasite burden during *Toxocara canis* infection in mice. PLoS Negl Trop Dis 2021;15:e0009639. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009639.
- [300] Li Z-Y, Xiao L, Lin G, Tang J, Chen Y, Chen L, et al. Contribution of tissue transglutaminase to the severity of hepatic fibrosis resulting from *Schistosoma japonicum* infection through the regulation of IL-33/ST2 expression. Parasit Vectors 2019;12:302. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3542-4.
- [301] Peng H, Zhang Q, Li X, Liu Z, Shen J, Sun R, et al. IL-33 Contributes to Schistosoma japonicuminduced Hepatic Pathology through Induction of M2 Macrophages. Sci Rep 2016;6:29844. https://doi.org/10.1038/srep29844.
- [302] Maggi L, Rocha IC, Camelo GMA, Fernandes VR, Negrão-Corrêa D. The IL-33/ST2 pathway is not essential to Th2 stimulation but is key for modulation and survival during chronic infection with Schistosoma mansoni in mice. Cytokine 2021;138:155390. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155390.
- [303] Zhang B, Wu X, Li J, Ning A, Zhang B, Liu J, et al. Hepatic progenitor cells promote the repair of schistosomiasis liver injury by inhibiting IL-33 secretion in mice. Stem Cell Res Ther 2021;12:546. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02589-y.
- [304] Bai Y, Guan F, Zhu F, Jiang C, Xu X, Zheng F, et al. IL-33/ST2 axis deficiency exacerbates hepatic pathology by regulating Treg and Th17 cells in murine schistosomiasis japonica. J Inflamm Res 2021;14:5981–98. https://doi.org/10.2147/JIR.S336404.
- [305] Taylor DH, Morris DL, Richards KS, Reffin D. Echinococcus multilocularis: in vivo results of therapy with albendazole and praziquantel. Trans R Soc Trop Med Hyg 1988;82:611–5. https://doi.org/10.1016/0035-9203(88)90528-7.
- [306] Rausch R, Jentoft VL. Studies on the Helminth Fauna of Alaska. XXXI. Observations on the propagation of the larval *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863, *in vitro*. The Journal of Parasitology 1957;43:1–8. https://doi.org/10.2307/3274741.
- [307] Hemer S, Brehm K. In vitro efficacy of the anticancer drug imatinib on *Echinococcus multilocularis* larvae. Int J Antimicrob Agents 2012;40:458–62. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.07.007.
- [308] Lawton P, Walchshofer N, Sarciron ME. In vitro effects of isoprinosine and a dipeptide methyl ester on *Echinococcus multilocularis* protoscoleces. J Helminthol 2001;75:251–7.
- [309] Jura H, Bader A, Frosch M. In vitro activities of benzimidazoles against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:1052–6. https://doi.org/10.1128/AAC.42.5.1052.

- [310] Stadelmann B, Spiliotis M, Müller J, Scholl S, Müller N, Gottstein B, et al. Echinococcus multilocularis phosphoglucose isomerase (EmPGI): a glycolytic enzyme involved in metacestode growth and parasite-host cell interactions. Int J Parasitol 2010;40:1563–74. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.05.009.
- [311] Stadelmann B, Scholl S, Müller J, Hemphill A. Application of an in vitro drug screening assay based on the release of phosphoglucose isomerase to determine the structure-activity relationship of thiazolides against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. J Antimicrob Chemother 2010;65:512–9. https://doi.org/10.1093/jac/dkp490.
- [312] Rufener R, Ritler D, Zielinski J, Dick L, da Silva ET, da Silva Araujo A, et al. Activity of mefloquine and mefloquine derivatives against *Echinococcus multilocularis*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2018;8:331–40. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.06.004.
- [313] Stettler M, Siles-Lucas M, Sarciron E, Lawton P, Gottstein B, Hemphill A. Echinococcus multilocularis alkaline phosphatase as a marker for metacestode damage induced by in vitro drug treatment with albendazole sulfoxide and albendazole sulfone. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2256–62. https://doi.org/10.1128/AAC.45.8.2256-2262.2001.
- [314] Stettler M, Fink R, Walker M, Gottstein B, Geary TG, Rossignol JF, et al. *In vitro* parasiticidal effect of Nitazoxanide against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:467–74. https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.467-474.2003.
- [315] Xin Q, Yuan M, Li H, Song X, Lu J, Jing T. In vitro and in vivo effects of 3-bromopyruvate against *Echinococcus* metacestodes. Vet Res 2019;50:96. https://doi.org/10.1186/s13567-019-0710-7.
- [316] Xin Q, Yuan M, Li H, Lu J, Song X, Jing T. In vitro efficacy of ampelopsin against Echinococcus granulosus and Echinococcus multilocularis. J Vet Med Sci 2019;81:1853–8. https://doi.org/10.1292/jvms.19-0347.
- [317] Xin Q, Lv W, Xu Y, Luo Y, Zhao C, Wang B, et al. 2-Deoxy-D-glucose and combined 2-Deoxy-D-glucose/albendazole exhibit therapeutic efficacy against *Echinococcus granulosus* protoscoleces and experimental alveolar echinococcosis. PLoS Negl Trop Dis 2022;16:e0010618. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010618.
- [318] Stadelmann B, Rufener R, Aeschbacher D, Spiliotis M, Gottstein B, Hemphill A. Screening of the open source malaria box reveals an early lead compound for the treatment of alveolar echinococcosis. PLoS Negl Trop Dis 2016;10:e0004535. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004535.
- [319] Spiliotis M, Tappe D, Sesterhenn L, Brehm K. Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions. Parasitol Res 2004;92:430–2. https://doi.org/10.1007/s00436-003-1046-8.
- [320] Lundström-Stadelmann B, Rufener R, Ritler D, Zurbriggen R, Hemphill A. The importance of being parasiticidal... an update on drug development for the treatment of alveolar echinococcosis. Food Waterborne Parasitol 2019;15:e00040. https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00040.
- [321] Spicher M, Naguleswaran A, Ortega-Mora LM, Müller J, Gottstein B, Hemphill A. In vitro and in vivo effects of 2-methoxyestradiol, either alone or combined with albendazole, against *Echinococcus* metacestodes. Exp Parasitol 2008;119:475–82. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.02.012.
- [322] Matsumoto J, Müller N, Hemphill A, Oku Y, Kamiya M, Gottstein B. 14-3-3- and II/3-10-gene expression as molecular markers to address viability and growth activity of *Echinococcus*

multilocularis metacestodes. Parasitology 2006;132:83–94. https://doi.org/10.1017/S0031182005008632.

- [323] Ingold K, Bigler P, Thormann W, Cavaliero T, Gottstein B, Hemphill A. Efficacies of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone against In vitro-cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1052–61. https://doi.org/10.1128/AAC.43.5.1052.
- [324] Richter D, Richter J, Grüner B, Kranz K, Franz J, Kern P. In vitro efficacy of triclabendazole and clorsulon against the larval stage of *Echinococcus multilocularis*. Parasitol Res 2013;112:1655–60. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3321-7.
- [325] Reuter S, Merkle M, Brehm K, Kern P, Manfras B. Effect of amphotericin B on larval growth of *Echinococcus multilocularis*. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:620–5. https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.620-625.2003.
- [326] Cheng Z, Xu Z, Tian H, Liu F, Li X, Luo D, et al. *In vitro* and *in vivo* efficacies of the EGFR/MEK/ERK signaling inhibitors in the treatment of alveolar echinococcosis. Antimicrob Agents Chemother 2020;64:e00341-20. https://doi.org/10.1128/AAC.00341-20.
- [327] Dang Z, Xu S, Zhang H, Gui W, Zhao Y, Duan L, et al. In vitro and in vivo efficacies of carbazole aminoalcohols in the treatment of alveolar echinococcosis. Acta Trop 2018;185:138–43. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.05.007.
- [328] Enkai S, Kouguchi H, Inaoka DK, Irie T, Yagi K, Kita K. In vivo efficacy of combination therapy with albendazole and atovaquone against primary hydatid cysts in mice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2021;40:1815–20. https://doi.org/10.1007/s10096-021-04230-5.
- [329] Enkai S, Inaoka DK, Kouguchi H, Irie T, Yagi K, Kita K. Mitochondrial complex III in larval stage of *Echinococcus multilocularis* as a potential chemotherapeutic target and in vivo efficacy of atovaquone against primary hydatid cysts. Parasitology International 2020;75:102004. https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.102004.
- [330] Liu Z, Guo X, Guo A, Zhang S, Zou Y, Wang Y, et al. HIV protease inhibitor nelfinavir is a potent drug candidate against echinococcosis by targeting Ddi1-like protein. EBioMedicine 2022;82:104177. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104177.
- [331] Liu C, Fan H, Ma J, Ma L, Ge R-L. In vitro and in vivo efficacy of thiacloprid against *Echinococcus multilocularis*. Parasit Vectors 2021;14:450. https://doi.org/10.1186/s13071-021-04952-7.
- [332] Lopez LM, Pensel PE, Fabbri J, Albani CM, Elissondo N, Gambino G, et al. The combination of carvacrol and albendazole enhanced the efficacy of monotherapy in experimental alveolar echinococcosis. Acta Trop 2022;225:106198. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106198.
- [333] Loos JA, Coccimiglio M, Nicolao MC, Rodrigues CR, Cumino AC. Metformin improves the therapeutic efficacy of low-dose albendazole against experimental alveolar echinococcosis. Parasitology 2022;149:138–44. https://doi.org/10.1017/S0031182021001633.
- [334] Schubert A, Koziol U, Cailliau K, Vanderstraete M, Dissous C, Brehm K. Targeting *Echinococcus multilocularis* stem cells by inhibition of the Polo-like kinase EmPlk1. PLoS Negl Trop Dis 2014;8:e2870. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002870.
- [335] Reuter S, Manfras B, Merkle M, Härter G, Kern P. In vitro activities of itraconazole, methiazole, and nitazoxanide versus *Echinococcus multilocularis* larvae. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2966–70. https://doi.org/10.1128/AAC.00476-06.
- [336] Mathis A, Wild P, Boettger EC, Kapel CMO, Deplazes P. Mitochondrial ribosome as the target for the macrolide antibiotic clarithromycin in the helminth *Echinococcus multilocularis*.

Antimicrob Agents Chemother 2005;49:3251–5. https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3251-3255.2005.

- [337] Koike A, Becker F, Sennhenn P, Kim J, Zhang J, Hannus S, et al. Targeting *Echinococcus multilocularis* PIM kinase for improving anti-parasitic chemotherapy. PLoS Negl Trop Dis 2022;16:e0010483. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010483.
- [338] Küster T, Stadelmann B, Aeschbacher D, Hemphill A. Activities of fenbendazole in comparison with albendazole against *Echinococcus multilocularis* metacestodes in vitro and in a murine infection model. Int J Antimicrob Agents 2014;43:335–42. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.013.
- [339] Küster T, Stadelmann B, Hermann C, Scholl S, Keiser J, Hemphill A. *In vitro* and *in vivo* efficacies of mefloquine-based treatment against alveolar echinococcosis. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:713–21. https://doi.org/10.1128/AAC.01392-10.
- [340] Stadelmann B, Küster T, Scholl S, Barna F, Kropf C, Keiser J, et al. *In vitro* efficacy of dicationic compounds and mefloquine enantiomers against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:4866–72. https://doi.org/10.1128/AAC.00478-11.
- [341] Küster T, Kriegel N, Boykin DW, Stephens CE, Hemphill A. *In vitro* and *in vivo* activities of dicationic diguanidino compounds against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:3829–35. https://doi.org/10.1128/AAC.02569-12.
- [342] Küster T, Lense N, Barna F, Hemphill A, Kindermann MK, Heinicke JW, et al. A new promising application for highly cytotoxic metal compounds: η6-areneruthenium(II) phosphite complexes for the treatment of alveolar echinococcosis. J Med Chem 2012;55:4178–88. https://doi.org/10.1021/jm300291a.
- [343] Joekel DE, Lundström-Stadelmann B, Müllhaupt B, Hemphill A, Deplazes P. Evaluation of kinase-inhibitors nilotinib and everolimus against alveolar echinococcosis in vitro and in a mouse model. Exp Parasitol 2018;188:65–72. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.04.002.
- [344] Stadelmann B, Aeschbacher D, Huber C, Spiliotis M, Müller J, Hemphill A. Profound activity of the anti-cancer drug bortezomib against *Echinococcus multilocularis* metacestodes identifies the proteasome as a novel drug target for cestodes. PLoS Negl Trop Dis 2014;8:e3352. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003352.
- [345] Spicher M, Roethlisberger C, Lany C, Stadelmann B, Keiser J, Ortega-Mora LM, et al. In vitro and in vivo treatments of echinococcus protoscoleces and metacestodes with artemisinin and artemisinin derivatives. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3447–50. https://doi.org/10.1128/AAC.00553-08.
- [346] Rufener R, Dick L, D'Ascoli L, Ritler D, Hizem A, Wells TNC, et al. Repurposing of an old drug: In vitro and in vivo efficacies of buparvaquone against Echinococcus multilocularis. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2018;8:440–50. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.10.011.
- [347] Liu C, Fan H, Guan L, Ge R, Ma L. In vivo and in vitro efficacy of crocin against *Echinococcus multilocularis*. Parasit Vectors 2021;14:364. https://doi.org/10.1186/s13071-021-04866-4.
- [348] Chaudhry S, Zurbriggen R, Preza M, Kämpfer T, Kaethner M, Memedovski R, et al. Dual inhibition of the *Echinococcus multilocularis* energy metabolism. Front Vet Sci 2022;9:981664. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.981664.
- [349] Stettler M, Rossignol JF, Fink R, Walker M, Gottstein B, Merli M, et al. Secondary and primary murine alveolar echinococcosis: combined albendazole/nitazoxanide chemotherapy exhibits profound anti-parasitic activity. Int J Parasitol 2004;34:615–24. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.006.

- [350] Gao H-J, Sun X-D, Luo Y-P, Pang H-S, Ma X-M, Zhang T, et al. Anti-echinococcal effect of verapamil involving the regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase II response in vitro and in a murine infection model. Parasit Vectors 2021;14:108. https://doi.org/10.1186/s13071-021-04618-4.
- [351] Vanparijs O. Chemotherapy of experimental *Echinococcus multilocularis* in jirds. Parasitol Res 1990;76:238–40. https://doi.org/10.1007/BF00930820.
- [352] Schantz PM, Van den Bossche H, Eckert J. Chemotherapy for larval echinococcosis in animals and humans: report of a workshop. Z Parasitenkd 1982;67:5–26. https://doi.org/10.1007/BF00929509.
- [353] Wilson JF, Rausch RL, McMahon BJ, Schantz PM. Parasiticidal effect of chemotherapy in alveolar hydatid disease: review of experience with mebendazole and albendazole in Alaskan Eskimos. Clin Infect Dis 1992;15:234–49. https://doi.org/10.1093/clinids/15.2.234.
- [354] Davis A, Pawlowski ZS, Dixon H. Multicentre clinical trials of benzimidazolecarbamates in human echinococcosis. Bull World Health Organ 1986;64:383–8.
- [355] Lassègue A, Estavoyer JM, Minazzi H, Barale T, Gillet M, Vuitton D, et al. [Treatment of human alveolar echinococcosis with flubendazole. Clinical, morphological and immunological study]. Gastroenterol Clin Biol 1984;8:314–20.
- [356] Lacey E. Mode of action of benzimidazoles. Parasitol Today 1990;6:112–5. https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90227-u.
- [357] Robinson MW, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I. A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. J Mol Graph Model 2004;23:275–84. https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2004.08.001.
- [358] Shi Q, Liu C, Huo L, Tao Y, Zhang H. Silencing TUBB3 expression destroys the tegument and flame cells of *Echinococcus multilocularis* protoscoleces. Animals 2022;12:2471. https://doi.org/10.3390/ani12182471.
- [359] Brehm K, Kronthaler K, Jura H, Frosch M. Cloning and characterization of β-tubulin genes from *Echinococcus multilocularis*. Mol Biochem Parasitol 2000;107:297–302. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00178-X.
- [360] Koziol U, Rauschendorfer T, Zanon Rodríguez L, Krohne G, Brehm K. The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. Evodevo 2014;5:10. https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-10.
- [361] Koziol U, Brehm K. Recent advances in *Echinococcus* genomics and stem cell research. Vet Parasitol 2015;213:92–102. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.031.
- [362] Ricken FJ, Nell J, Grüner B, Schmidberger J, Kaltenbach T, Kratzer W, et al. Albendazole increases the inflammatory response and the amount of Em2-positive small particles of *Echinococcus multilocularis* (spems) in human hepatic alveolar echinococcosis lesions. PLoS Negl Trop Dis 2017;11:e0005636. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005636.
- [363] Wang J, Marreros N, Rufener R, Hemphill A, Gottstein B, Lundström-Stadelmann B. Short communication: Efficacy of albendazole in *Echinococcus multilocularis*-infected mice depends on the functional immunity of the host. Exp Parasitol 2020;219:108013. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108013.
- [364] Weingartner M, Stücheli S, Jebbawi F, Gottstein B, Beldi G, Lundström-Stadelmann B, et al. Albendazole reduces hepatic inflammation and endoplasmic reticulum-stress in a mouse model of chronic *Echinococcus multilocularis* infection. PLoS Negl Trop Dis 2022;16:e0009192. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009192.

- [365] Albendazole. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury, Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012.
- [366] Carlsson G, Patring J, Ullerås E, Oskarsson A. Developmental toxicity of albendazole and its three main metabolites in zebrafish embryos. Reprod Toxicol 2011;32:129–37. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.05.015.
- [367] Eckardt K, Kaltenhäuser J, Kilb C, Seiler A, Stahlmann R. Relative potency of albendazole and its sulfoxide metabolite in two in vitro tests for developmental toxicity: the rat whole embryo culture and the mouse embryonic stem cell test. Reprod Toxicol 2012;34:378–84. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.037.
- [368] Baldolli A, Bonhomme J, Yera H, Grenouillet F, Chapon F, Barbier C, et al. Isolated cerebral alveolar echinococcosis. Open Forum Infect Dis 2019;6:ofy349. https://doi.org/10.1093/ofid/ofy349.
- [369] Antolová D, Reiterová K. Influence of *Echinococcus multilocularis* infection on reproduction and cellular immune response of mice. Parasite Immunol 2010;32:384–7. https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01194.x.
- [370] Porubcová J, Dvorožňáková E, Ševčíková Z. Immune response of mice to *Echinococcus multilocularis* infection after therapy with amphotericin B colloidal dispersion. Helminthologia 2007;44:47–56. https://doi.org/10.2478/s11687-007-0003-y.
- [371] Reuter S, Beisler T, Kern P. Combined albendazole and amphotericin B against *Echinococcus multilocularis* in vitro. Acta Trop 2010;115:270–4. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.04.009.
- [372] Tappe D, Müller A, Frosch M, Stich A. Limitations of amphotericin B and nitazoxanide in the treatment of alveolar echinococcosis. Ann Trop Med Parasitol 2009;103:177–81. https://doi.org/10.1179/136485909X385036.
- [373] Küster T, Stadelmann B, Rufener R, Risch C, Müller J, Hemphill A. Oral treatments of *Echinococcus multilocularis*-infected mice with the antimalarial drug mefloquine that potentially interacts with parasite ferritin and cystatin. Int J Antimicrob Agents 2015;46:546– 51. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.016.
- [374] Kern P, Abboud P, Kern W, Stich A, Bresson-Hadni S, Guerin B, et al. Critical appraisal of nitazoxanide for the treatment of alveolar echinococcosis. Am J Trop Med Hyg 2008;79:119.
- [375] Hemphill A, Stadelmann B, Rufener R, Spiliotis M, Boubaker G, Müller J, et al. Treatment of echinococcosis: albendazole and mebendazole – what else? Parasite 2014;21:70. https://doi.org/10.1051/parasite/2014073.
- [376] Hübner C, Wiehr S, Kocherscheidt L, Wehrl H, Pichler BJ, Schmid A, et al. Effects of *in vitro* exposure of *Echinococcus multilocularis* metacestodes to cytostatic drugs on *in vivo* growth and proliferation of the parasite. Parasitol Res 2010;107:459–63. https://doi.org/10.1007/s00436-010-1892-0.
- [377] Huang X, Wiehr S, Wild A-M, Voßberg P, Hoffmann W, Grüner B, et al. The effects of taxanes, vorinostat and doxorubicin on growth and proliferation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes assessed with magnetic resonance imaging and simultaneous positron emission tomography. Oncotarget 2018;9:9073–87. https://doi.org/10.18632/oncotarget.24142.
- [378] Xin Q, Yuan M, Li H, Song X, Lu J, Jing T. In vitro effects of lonidamine and 6aminonicotinamide against *Echinococcus granulosus sensu stricto* and *Echinococcus multilocularis*. Vet Res 2020;51:29. https://doi.org/10.1186/s13567-020-00744-6.

- [379] Yuan M, Luo Y, Xin Q, Gao H, Zhang G, Jing T. Efficacy of osthole for *Echinococcus granulosus in vitro* and *Echinococcus multilocularis in vivo*. Vet Parasitol 2016;226:38–43. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.016.
- [380] Albani CM, Pensel PE, Elissondo N, Gambino G, Elissondo MC. *In vivo* activity of albendazole in combination with thymol against *Echinococcus multilocularis*. Vet Parasitol 2015;212:193–9. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.030.
- [381] Albani CM, Elissondo MC. Efficacy of albendazole in combination with thymol against *Echinococcus multilocularis* protoscoleces and metacestodes. Acta Trop 2014;140:61–7. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.08.007.
- [382] Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. Nat Rev Drug Discov 2021;20:101–24. https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8.
- [383] Briolay T, Petithomme T, Fouet M, Nguyen-Pham N, Blanquart C, Boisgerault N. Delivery of cancer therapies by synthetic and bio-inspired nanovectors. Mol Cancer 2021;20:55. https://doi.org/10.1186/s12943-021-01346-2.
- [384] Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres M del P, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. J Nanobiotechnology 2018;16:71. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8.
- [385] Liance M, Nemati F, Bories C, Couvreur P. Experience with doxorubicin-bound polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles on murine alveolar echinococcosis of the liver. Int J Parasitol 1993;23:427–9. https://doi.org/10.1016/0020-7519(93)90023-r.
- [386] Rodrigues JM, Bories C, Emery I, Fessi H, Devissaguet JP, Liance M. Development of an injectable formulation of albendazole and in vivo evaluation of its efficacy against *Echinococcus multilocularis* metacestode. Int J Parasitol 1995;25:1437–41. https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00055-0.
- [387] Wen H, New RR, Muhmut M, Wang JH, Wang YH, Zhang JH, et al. Pharmacology and efficacy of liposome-entrapped albendazole in experimental secondary alveolar echinococcosis and effect of co-administration with cimetidine. Parasitology 1996;113 (Pt 2):111–21. https://doi.org/10.1017/s003118200006635x.
- [388] Abulaihaiti M, Wu X-W, Qiao L, Lv H-L, Zhang H-W, Aduwayi N, et al. Efficacy of albendazolechitosan microsphere-based treatment for alveolar echinococcosis in mice. PLoS Negl Trop Dis 2015;9:e0003950. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003950.
- [389] Dvoroznáková E, Hrcková G, Borosková Z, Velebný S, Dubinský P. Effect of treatment with free and liposomized albendazole on selected immunological parameters and cyst growth in mice infected with *Echinococcus multilocularis*. Parasitol Int 2004;53:315–25. https://doi.org/10.1016/j.parint.2004.05.001.
- [390] Li H, Song T, Qin Y, Liu W, Li X, Shao Y, et al. Efficiency of liposomal albendazole for the treatment of the patients with complex alveolar echinococcosis: a comparative analysis of CEUS, CT, and PET/CT. Parasitol Res 2015;114:4175–80. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4649-y.
- [391] Li Z, Zhang G, Luo Y, Gao Q, Wang J, Chen C, et al. In vivo effect of magnetic microspheres loaded with E2-a in the treatment of alveolar echinococcosis. Sci Rep 2020;10:12589. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69484-z.

- [392] Hu C, Liu Z, Liu C, Zhang Y, Fan H, Qian F. Improvement of antialveolar echinococcosis efficacy of albendazole by a novel nanocrystalline formulation with enhanced oral bioavailability. ACS Infect Dis 2020;6:802–10. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00231.
- [393] Fabbri J, Pensel PE, Albani CM, Lopez LM, Simonazzi A, Bermudez JM, et al. Albendazole solid dispersions against alveolar echinococcosis: a pharmacotechnical strategy to improve the efficacy of the drug. Parasitology 2020;147:1026–31. https://doi.org/10.1017/S0031182020000670.
- [394] Pensel P, Paredes A, Albani CM, Allemandi D, Sanchez Bruni S, Palma SD, et al. Albendazole nanocrystals in experimental alveolar echinococcosis: Enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy in infected mice. Vet Parasitol 2018;251:78–84. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.12.022.
- [395] Hu C, Liu Z, Liu C, Li J, Wang Z, Xu L, et al. Enhanced oral bioavailability and anti-echinococcosis efficacy of albendazole achieved by optimizing the "spring" and "parachute." Mol Pharm 2019;16:4978–86. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00851.
- [396] Shuhua X, Jiqing Y, Mingjie W, Pieying J, Fanghua G, Junjie C, et al. Augmented bioavailability and cysticidal activity of albendazole reformulated in soybean emulsion in mice infected with *Echinococcus granulosus* or *Echinococcus multilocularis*. Acta Trop 2002;82:77–84. https://doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00027-x.
- [397] Liu C, Han X, Lei W, Yin J-H, Wu S-L, Zhang H-B. The efficacy of an alternative mebendazole formulation in mice infected with *Echinococcus multilocularis*. Acta Trop 2019;196:72–5. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.009.
- [398] Ahmadnia S, Moazeni M, Mohammadi-Samani S, Oryan A. In vivo evaluation of the efficacy of albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide loaded solid lipid nanoparticles against hydatid cyst. Exp Parasitol 2013;135:314–9. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.017.
- [399] Ahmadpour E, Godrati-Azar Z, Spotin A, Norouzi R, Hamishehkar H, Nami S, et al. Nanostructured lipid carriers of ivermectin as a novel drug delivery system in hydatidosis. Parasit Vectors 2019;12:469. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3719-x.
- [400] Aminpour S, Rafiei A, Jelowdar A, Kouchak M. Evaluation of the protoscolicidal effects of albendazole and albendazole loaded solid lipid nanoparticles. Iran J Parasitol 2019;14:127–35.
- [401] Farhadi M, Haniloo A, Rostamizadeh K, Ahmadi N. In vitro evaluation of albendazole-loaded nanostructured lipid carriers on *Echinococcus granulosus* microcysts and their prophylactic efficacy on experimental secondary hydatidosis. Parasitol Res 2021;120:4049–60. https://doi.org/10.1007/s00436-021-07343-0.
- [402] Kohansal K, Rafiei A, Kalantari H, Jelowdar A, Salimi A, Rezaie A, et al. Nephrotoxicity of albendazole and albendazole loaded solid lipid nanoparticles in mice with experimental hydatidosis. Adv Pharm Bull 2022;12:102–8. https://doi.org/10.34172/apb.2022.011.
- [403] Pensel PE, Ullio Gamboa G, Fabbri J, Ceballos L, Sanchez Bruni S, Alvarez LI, et al. Cystic echinococcosis therapy: Albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice. Acta Trop 2015;152:185–94. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.016.
- [404] Ullio Gamboa GV, Pensel PE, Elissondo MC, Sanchez Bruni SF, Benoit J-P, Palma SD, et al. Albendazole-lipid nanocapsules: Optimization, characterization and chemoprophylactic efficacy in mice infected with *Echinococcus granulosus*. Exp Parasitol 2019;198:79–86. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.02.002.

- [405] Naseri M, Akbarzadeh A, Spotin A, Akbari NAR, Mahami-Oskouei M, Ahmadpour E. Scolicidal and apoptotic activities of albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide-loaded PLGA-PEG as a novel nanopolymeric particle against *Echinococcus granulosus* protoscoleces. Parasitol Res 2016;115:4595–603. https://doi.org/10.1007/s00436-016-5250-8.
- [406] Darvishi MM, Moazeni M, Alizadeh M, Abedi M, Tamaddon A-M. Evaluation of the efficacy of albendazole sulfoxide (ABZ-SO)-loaded chitosan-PLGA nanoparticles in the treatment of cystic echinococcosis in laboratory mice. Parasitol Res 2020;119:4233–41. https://doi.org/10.1007/s00436-020-06901-2.
- [407] Farhadi M, Haniloo A, Rostamizadeh K, Faghihzadeh S. Efficiency of flubendazole-loaded mPEG-PCL nanoparticles: A promising formulation against the protoscoleces and cysts of *Echinococcus granulosus*. Acta Trop 2018;187:190–200. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.010.
- [408] Torabi N, Dobakhti F, Faghihzadeh S, Haniloo A. In vitro and in vivo effects of chitosanpraziquantel and chitosan-albendazole nanoparticles on *Echinococcus granulosus* Metacestodes. Parasitol Res 2018;117:2015–23. https://doi.org/10.1007/s00436-018-5849-z.
- [409] Barabadi H, Honary S, Ali Mohammadi M, Ahmadpour E, Rahimi MT, Alizadeh A, et al. Green chemical synthesis of gold nanoparticles by using *Penicillium aculeatum* and their scolicidal activity against hydatid cyst protoscolices of Echinococcus granulosus. Environ Sci Pollut Res Int 2017;24:5800–10. https://doi.org/10.1007/s11356-016-8291-8.
- [410] Ezzatkhah F, Khalaf AK, Mahmoudvand H. Copper nanoparticles: Biosynthesis, characterization, and protoscolicidal effects alone and combined with albendazole against hydatid cyst protoscoleces. Biomed Pharmacother 2021;136:111257. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111257.
- [411] Mahmoudvand H, Fasihi Harandi M, Shakibaie M, Aflatoonian MR, ZiaAli N, Makki MS, et al. Scolicidal effects of biogenic selenium nanoparticles against protoscolices of hydatid cysts. Int J Surg 2014;12:399–403. https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.03.017.
- [412] Nassef NE, Saad A-GE, Harba NM, Beshay EVN, Gouda MA, Shendi SS, et al. Evaluation of the therapeutic efficacy of albendazole-loaded silver nanoparticles against *Echinococcus* granulosus infection in experimental mice. J Parasit Dis 2019;43:658–71. https://doi.org/10.1007/s12639-019-01145-z.
- [413] Norouzi R, Ataei A, Hejazy M, Noreddin A, El Zowalaty ME. Scolicidal effects of nanoparticles against hydatid cyst protoscolices *in vitro*. Int J Nanomedicine 2020;15:1095–100. https://doi.org/10.2147/IJN.S228538.
- [414] Rahimi MT, Ahmadpour E, Rahimi Esboei B, Spotin A, Kohansal Koshki MH, Alizadeh A, et al. Scolicidal activity of biosynthesized silver nanoparticles against *Echinococcus granulosus* protoscolices. Int J Surg 2015;19:128–33. https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2015.05.043.
- [415] Salih TA, Hassan KT, Majeed SR, Ibraheem IJ, Hassan OM, Obaid AS. *In vitro* scolicidal activity of synthesised silver nanoparticles from aqueous plant extract against *Echinococcus granulosus*. Biotechnol Rep 2020;28:e00545. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00545.
- [416] Alvi M, Yaqoob A, Rehman K, Shoaib SM, Akash MSH. PLGA-based nanoparticles for the treatment of cancer: current strategies and perspectives. AAPS Open 2022;8:12. https://doi.org/10.1186/s41120-022-00060-7.
- [417] Lundström-Stadelmann B, Rufener R, Hemphill A. Drug repurposing applied: Activity of the anti-malarial mefloquine against *Echinococcus multilocularis*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2020;13:121–9. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.06.002.

- [418] Belkina AC, Ciccolella CO, Anno R, Halpert R, Spidlen J, Snyder-Cappione JE. Automated optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding improve visualization and analysis of large datasets. Nat Commun 2019;10:5415. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13055-y.
- [419] Becht E, McInnes L, Healy J, Dutertre C-A, Kwok IWH, Ng LG, et al. Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. Nat Biotechnol 2018. https://doi.org/10.1038/nbt.4314.
- [420] Quintelier K, Couckuyt A, Emmaneel A, Aerts J, Saeys Y, Van Gassen S. Analyzing highdimensional cytometry data using FlowSOM. Nat Protoc 2021;16:3775–801. https://doi.org/10.1038/s41596-021-00550-0.
- [421] Hartmann FJ, Bendall SC. Immune monitoring using mass cytometry and related highdimensional imaging approaches. Nat Rev Rheumatol 2020;16:87–99. https://doi.org/10.1038/s41584-019-0338-z.
- [422] Hussain B, Kasinath V, Ashton-Rickardt GP, Clancy T, Uchimura K, Tsokos G, et al. High endothelial venules as potential gateways for therapeutics. Trends Immunol 2022;43:728–40. https://doi.org/10.1016/j.it.2022.07.002.
- [423] Blanchard L, Girard J-P. High endothelial venules (HEVs) in immunity, inflammation and cancer. Angiogenesis 2021;24:719–53. https://doi.org/10.1007/s10456-021-09792-8.
- [424] Allen E, Jabouille A, Rivera LB, Lodewijckx I, Missiaen R, Steri V, et al. Combined antiangiogenic and anti–PD-L1 therapy stimulates tumor immunity through HEV formation. Science Translational Medicine 2017;9:eaak9679. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aak9679.
- [425] Liu Q, Zhong Y, Su Y, Zhao L, Peng J. Real-Time Imaging of Hepatic Inflammation Using Hydrogen Sulfide-Activatable Second Near-Infrared Luminescent Nanoprobes. Nano Lett 2021;21:4606–14. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c00548.
- [426] Yu Z, He Y, Schomann T, Wu K, Hao Y, Suidgeest E, et al. Achieving Effective Multimodal Imaging with Rare-Earth Ion-Doped CaF2 Nanoparticles. Pharmaceutics 2022;14:840. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040840.
- [427] Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol 2005;23:1126–36. https://doi.org/10.1038/nbt1142.
- [428] Vigor KL, Kyrtatos PG, Minogue S, Al-Jamal KT, Kogelberg H, Tolner B, et al. Nanoparticles functionalized with recombinant single chain Fv antibody fragments (scFv) for the magnetic resonance imaging of cancer cells. Biomaterials 2010;31:1307–15. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.036.
- [429] Rickard MD, Davies C, Bout DT, Smyth JD. Immunohistological localisation of two hydatid antigens (antigen 5 and antigen B) in the cyst wall, brood capsules and protoscoleces of Echinococcus granulosus (ovine and equine) and E. multilocularis using immunoperoxidase methods. J Helminthol 1977;51:359–64. https://doi.org/10.1017/S0022149X00007719.
- [430] Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Yamasaki H, Gottstein B, Lightowers MW, et al. Alveolar echinococcosis: characterization of diagnostic antigen Em18 and serological evaluation of recombinant Em18. J Clin Microbiol 2002;40:2760–5. https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2760-2765.2002.

ANNEXE

1 Narrative review

- 2 Alveolar echinococcosis in immunocompromised hosts and respective management
- 3 Brice Autier^{a#}, Bruno Gottstein^b, Laurence Millon^{c,d,e}, Michael Ramharter^{e,f}, Beate Gruener^g, Solange
- 4 Bresson-Hadni^{c,h}, Sarah Dionⁱ, Florence Robert-Gangneux^{a,e}
- ⁵ ^a Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et
- 6 travail), UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France
- 7 ^b Institute of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Bern, CH-3012 Bern, Switzerland
- 8 ^c Department of Parasitology-Mycology, National Reference Centre for Echinococcoses, University
- 9 Hospital of Besançon, France
- 10 ^d UMR CNRS 6249 Laboratoire Chrono-environnement, Université Bourgogne-Franche-Comté,
- 11 Besançon, France
- 12 ^e European Study Group of Clinical Parasitology, ESCMID, Basel, Switzerland
- 13 ^f Center for Tropical Medicine; Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine & I Dept. of Medicine
- 14 University Medical Center Hamburg-Eppendorf, D-20359 Hamburg, Germany
- 15 ^g Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine III, University Hospital of Ulm, D-
- 16 89081 Ulm, Germany
- ¹⁷ ^h Division of Tropical and Humanitarian Medicine and Gastroenterology and Hepatology Unit, Faculty
- 18 of Medicine, University Hospitals of Geneva, Switzerland
- 19 ⁱ Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) -
- 20 UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

- 21 [#]brice.autier@univ-rennes1.fr ; Université Rennes 1, Inserm U1085 et Centre Hospitalier
- 22 Universitaire de Rennes, Service de Parasitologie-Mycologie, 2 Avenue du Pr Léon Bernard ; 35043
- 23 RENNES CEDEX, France ; Tel : +33299284268

24 ABSTRACT

25 **Background.** Alveolar echinococcosis (AE) results of an infection with the larval stage of the cestode

26 Echinococcus multilocularis, one of the most lethal helminthic diseases. It has been increasingly

27 described in individuals having experienced a situation of immune deficiency. So far,

28 recommendations made for the management of these patients have not been specifically adapted to

29 the type of immune background of these patients.

30 **Objectives.** This narrative review aims at describing the clinical presentation of AE in association to

31 the specific type of immunodeficiency affecting these patients, based on retrospective cohorts and

32 case reports. Implications for patient management are accordingly proposed.

33 Sources. Targeted search was conducted in PubMed using ((alveolar echinococcosis) OR

34 (multilocularis)) AND ((immunosuppressive) OR (immunodeficiency) OR (AIDS) OR (solid-organ

35 transplant) OR (auto-immunity) OR (children)).

36 **Content.** Parasite growth and dissemination is favoured by putative alterations of cellular immunity.

37 Therefore, patients at risk for particularly aggressive clinical course of AE are those exposed to long-

38 term immunosuppressive therapy or with prolonged immunodeficiency. Solid organ transplantation

39 (SOT) and chronic inflammatory/autoimmune diseases were the most commonly described clinical

40 conditions associated with unusually extensive or disseminated infection. However, HIV infection (if

41 appropriately treated) and malignancies, which are frequently associated with opportunistic

42 infections, were unlikely associated with aggressive forms of AE. Although AE is rarely diagnosed in

43 children, it usually has a more severe outcome.

Implications. At least SOT recipients and patients with inflammatory/autoimmune diseases, who are the most at risk for AE due to their long-term immunosuppression, should be screened with specific serological tests and imaging before onset of immunosuppressive therapy. Preventive measures should be explained to immunocompromised patients who live in endemic areas. Pediatric AE cases should be further investigated, as AE could reveal rare primary immune deficiencies.

KEYWORDS

- *Echinococcus multilocularis,* alveolar echinococcosis, immunosuppressive therapy, transplantation,
- 51 HIV, cancer, malignant hemopathy, congenital immune deficiency

52 INTRODUCTION

53 Alveolar echinococcosis (AE) is a parasitic disease due to the infection with the larval stage of Echinococcus multilocularis, a tapeworm of canids (especially foxes) [1]. Adults of E. multilocularis 54 55 reside in the small intestine of definitive hosts, and spread eggs with their droppings. In intermediate 56 hosts, ingestion of eggs can lead to the development of the larval stage in the liver tissue. Only a few proportion of infected humans will actually develop viable parasitic lesions [2]. Host and pathogen 57 58 factors that might explain such variability remain to be unravelled, but there is cumulative evidence 59 that host innate and acquired immune response is important in the clinical outcome. After a short 60 description of the immunological events involved in the antiparasitic response, this review will 61 analyse clinical cases reported in each category of immune suppression backgrounds, and discuss 62 implications for the management of these patients.

63 PATHOPHYSIOLOGY OF ALVEOLAR ECHINOCOCCOSIS

64 Human infection occurs after accidental ingestion of eggs through contaminated food or water, or hand-to-mouth route. In the digestive tract, eggs release an oncosphere, which accedes to the blood 65 66 circulation by passing through the intestinal mucosa, then establishes in any vascularized organ, with 67 a preferential location in the liver as it filters the blood from the portal vein. There, it develops into 68 the larval stage, also called metacestode [3]. In natural intermediate hosts, such as small rodents, the 69 metacestode is a multicystic structure containing protoscoleces. In accidental hosts, such as humans, 70 microcysts are less well-defined and rarely contain protoscoleces. The metacestode finally takes the 71 shape of a heterogeneous mass that actively proliferates at its periphery, surrounded by a strong 72 infiltration of immune cells associated with dense fibrotic tissue and epithelioid cells, and optionally 73 containing central caseous necrosis and calcifications [4].

Host-parasite interactions in human tissues are highly complex and lead to various clinical
presentations. In most cases (detected e.g. upon species-specific serology), no parasitic lesion is
observed, suggesting that the parasite has been killed in the intestinal mucosa or in the liver

77 parenchyma during its early establishment [2]. In about 20% of cases, the infection aborts 78 spontaneously at a later stage, forming a calcified non-viable parasite lesion, etiologically diagnosed 79 on the basis of a positive serology, or, if surgically resected, upon histology and PCR of resected 80 tissue or core-needle-aspirated specimen [5]. These are called aborted or died-out lesions [2,3]. 81 Finally, the evolutive form of AE, consisting of a viable parasite which continuously develops until its 82 host dies, affects only a small percentage of infected people [2]. Discrimination between evolutive and aborted lesions in humans is often difficult. Currently, the best marker to assess viability of the 83 84 parasite is the detection of anti-Em18 antibodies, which can be detected by ELISA [17–19], and/or 85 PET-scan [20]. [18,20]

86 Dendritic cells and macrophages are the first immune cells involved in parasite recognition; they 87 initiate a pro-inflammatory immune response and recruit CD4⁺ Th1 and Th17 T cells, which are 88 considered to be putatively efficient against the parasite [11]. In susceptible hosts, the response 89 progressively turns into a mixed Th1/Th2 response, allowing parasite survival [11]. Also, numerous 90 studies showed that Treg lymphocytes and IL-10 secretion are important actors in favouring disease 91 progression, as they support periparasitic immune tolerance [11]. Humoral immunity, although 92 present, is not considered effective in the control of AE. Key facts concerning AE immunity are 93 summarized in Table 1.

94

95 Table 1. Summary of research findings about immunity in alveolar echinococcosis

	Associated with parasite	Associated with parasite		
Factor	control	development	References	
	M1 macrophages,			
		M2 macrophages, Th2 and Treg		
Cell populations	polymorphonuclear, NK, Th1	cells	[4,11–18]	
	and Th17 cells			
		IL-4. IL-5. IL-9. IL-10. IL-13. TGF-	[4.11.15.19	
Cytokines	IFN-α, IL-12, TNF-α, IFN-γ, IL-17	,,,,,	[.),,,	
		β1, FGL-2	,20]	
Drugs	Albendazole, mebendazole	Cyclosporine, steroids	[11]	
-		-		
Tissue response	Type IV hypersensitivity, fibrosis	Angiogenesis	[4,21]	

96 OVERALL FINDINGS REGARDING IMMUNOCOMPROMISED PATIENTS

97 [23,24][21]A French retrospective study recorded 509 AE cases from 1982 to 2012, including 50 98 (10%) AE patients with immunosuppressive conditions (AE/IS) [21]. An increasing number of AE/IS 99 cases was observed since the 2000's (6/166 AE cases in 1992-2002, versus 42/229 AE cases in 2002-100 2012, p<0.01). Compared to AE cases in immunocompetent individuals (AE/IC), AE/IS cases were 101 diagnosed more often fortuitously (42% vs 78%, p<0.001) and earlier, since the PNM classification for 102 AE (P = parasitic mass in the liver, N = involvement of neighbouring organs, M = metastasis), based on 103 the TNM system for tumors [24], more often classified cases as stages I-II (23% vs 41% in AE/IC and 104 AE/IS, respectively, p<0.05). [20]Importantly, AE/IS was significantly associated with false negative 105 serology compared to AE/IC patients (14% vs 1%, p<0.001). Also, a high frequency of atypical liver 106 ultrasound and CT imaging findings were observed (48%), suggesting cancer metastasis, liver abscess, 107 haemangioma or hematoma instead of typical imaging (heterogeneous mass with calcifications and 108 clustered microcysts) (Fig 1) [22]. Interestingly, treatment efficacy was better in AE/IS patients 109 compared to AE/IC (51% vs 27% of lesion regression after 1 year of treatment, p<0.01), but the 110 authors also emphasized the high frequency of side effects (40%), possibly associated with high

111 concentrations of albendazole sulfoxide in plasma, thus encouraging pharmacological monitoring of 112 these patients. Mortality attributed to AE was not different between both groups (0% vs 2%), 113 however statistical significance was limited by the small size of the cohort. Another retrospective 114 study of AE patients, published by a Swiss team, also highlighted the recently emerging peculiarity of 115 AE/IS cases [24]. The study, which included 41 AE/IS out of 131 AE patients, did not identify any 116 association between immune status and clinical presentation or serology results. However, median 117 levels of anti-recEm18 antibodies at time of diagnosis were lower in AE/IS patients compared to 118 AE/IC patients, though not significant [24]. This was supported by a more recent Swiss retrospective 119 study, which included 38 AE/IS out of 189 AE cases [23]. Frequency of positive anti-recEm18 serology 120 was lower in AE/IS compared to AE/IC (26% and 46%, respectively, p=0.03), and diagnosis was more 121 frequently fortuitous (78% and 42%, respectively, p<0.001), as part of extensive check-up, especially 122 for solid malignancies requiring sequential abdominal imaging. Main facts and the number of 123 reported cases for each type of immune disorder are summarized in Table 2 and Table 3,

124 respectively.

125	[39]Table 2. Main f	acts regarding alveolar	echinococcosis and	immune suppression

Item	Characteristics during immune suppression		
Stage of disease at diagnosis	Earlier than in immunocompetent patients, due to		
	systematic extensive check-up ¹		
Liver imaging	Atypical US and CT presentations, suggesting cancer		
	metastasis, liver abscess, hemangioma or hematoma		
Sensitivity of serology	Lower than in immunocompetent patients (particularly		
	lower anti-recEm18 IgG antibody)		
Benzimidazole efficacy	Better than in immunocompetent patients		
Benzimidazole tolerance	High frequency of side effects		
Mortality imputable to AE	Not significantly different from immunocompetent patients		

- ¹This observation was made in European countries, benefiting from strong health care systems, but
- 127 can vary according to health policies
- 128 US, ultrasound; CT, computed tomography
- 129
- 130 Table 3. Summary of published cases and cohorts of alveolar echinococcosis in

131 immunocompromised patients

	Number of	Number of cases in	Progressive	_
Population				References
	case reports	cohort studies	AE ¹	
SOT ² recipients	48 ³	94	Yes	[21,23–31]
HIV/AIDS	2	2	Yes	[21,24,32,33]
Chronic				
inflammatory and	3	42	Yes	[21,23,24,31,34–
auto-immune				36]
disorders				
Malignancies	-	72 ⁵	No	[21,23,24,31]
Paediatrics	21	20	Yes	[32,37–49]
Pregnancy	1	-	Suspected	[50]

- ¹Progressive AE: unusually fast-growing or extensive AE
- 133 ²Solid organ transplant
- ³ Including 45 patients who had liver transplantation for incurable AE, and 2 and 1 patients who had
- 135 kidney and lung transplantation, respectively, for another indication
- 136 ⁴ Transplanted organs: 4 kidneys, 2 hearts, 1 liver, 2 not specified

⁵ Includes 44 solid cancers, 12 haematological malignant diseases and 16 "malignancies" (not
 specified)

139 ALVEOLAR ECHINOCOCCOSIS AND SOLID ORGAN TRANSPLANT RECIPIENTS

140 Due to their mechanisms of action on cellular immunity, immunosuppressive agents used for the 141 prevention of graft rejection (cyclosporin, tacrolimus, mycophenolate) theoretically facilitate AE 142 progression. Indeed, solid organ transplant (SOT) recipients were the first patients described with 143 rapidly extensive AE. In 1990, two patients who had liver transplantation for AE salvage and pre-144 existing pulmonary lesions, were reported as having rapidly growing lung lesions [25], and between 145 1990 and 1992, recurrence of AE was observed in the transplanted liver [25,26]. In 2003, Koch et al. 146 reported a 10-year survival of 45% in a retrospective cohort of 45 patients, managed by liver 147 transplantation for otherwise untreatable AE between 1985 and 1998 [27]. Among the twenty deaths 148 observed during follow-up, 5 (25%) were due to relapse, and 9 (45%) were perioperative deaths. 149 They highlighted the detection of new parasitic lesions (mostly in brain and lungs) in 16% (6/45), and 150 graft invasion in 16% (6/45). Similar clinical presentations were also reported in kidney and lung 151 transplant recipients [28–31]. These data suggest that SOT recipients can present unusually rapidly 152 progressive AE, with an increased risk of dissemination. Imaging and anti-E. multilocularis serology, 153 including anti-recEm18 ELISA, should be recommended in the pre-transplant workup for patients 154 who are living or have lived (even decades before) in endemic areas. Also, careful advice for AE 155 prevention should be given to SOT recipients currently living in endemic areas.

156 ALVEOLAR ECHINOCOCCOSIS AND HIV/AIDS

While HIV and *E. multilocularis* co-infection is often taken as an example of the opportunistic behaviour of the parasite, only few cases have been reported to date. The first was published in 1997, and was diagnosed in a six-year-old girl with AIDS [32]. The clinical presentation displayed multiple unusual features: the young age of the patient, the extensive parasite growth and the negative serological testing. Furthermore, the girl had a dramatically low CD4⁺T cell count (12/mm³) 162 and a negative lymphoproliferative assay with E. multilocularis antigen. A second case was published 163 7 years later, in a 40 year-old male [33]. Although the patient was immunocompromised over nearly 164 a decade (CD4⁺ T cells between 27 and 150/mm³), the parasite had an usual growth rate, as the 165 lesion was retrospectively observed on a CT scan performed 8 years before AE diagnosis. HIV 166 infection was mentioned in the French retrospective cohort: out of the 509 AE cases, only one 167 patient was co-infected with HIV [22]. The same observation was made in the recent Swiss cohort: 1 168 out of 189 AE patients had HIV infection [23]. Altogether, these reports showed that HIV is an 169 uncommon condition for accelerated AE development. Only a dramatically low CD4⁺ T cell count 170 appears to favour the parasite growth (< 20-50/mm³).

171 ALVEOLAR ECHINOCOCCOSIS AND CHRONIC INFLAMMATORY DISEASES OR AUTO-IMMUNE

172 DISORDERS

173 As for SOT, chronic inflammatory and autoimmune diseases are theoretically adequate backgrounds 174 for rapidly progressive AE. Indeed, most of these disorders are treated with long-term 175 immunosuppressive therapies, which often have broad-spectrum effects on immune effectors (e.g. 176 steroids, methotrexate...) or an anti-Th1 biological activity (e.g. TNF- α inhibitors, anakinra (IL-1 177 receptor antagonist)...). Such cases were actually reported in patients affected with auto-immune 178 encephalitis and rheumatoid arthritis [34–36]. Among the French cohort of AE/IS, 14/50 patients 179 (28%) had chronic inflammatory diseases, and 8/50 (16%) and 5/50 (10%) were treated with 180 methotrexate and TNF- α inhibitors, respectively [22]. Of note, 17/50 (34%) were treated with 181 steroids, without specification concerning the indication (SOT, malignancy, chronic inflammatory or 182 autoimmune disease or other) nor the dosage. In the 2019 Swiss cohort of 41 AE/IS cases, 14/41 (34%) had an autoimmune disease or an immunosuppressive therapy [24], a similar proportion as 183 184 observed for chronic inflammatory diseases in another Swiss cohort (11/38 AE/IS cases (29%)) [23]. 185 Although it seems probable that all immunosuppressive regimens do not equally favour AE, 186

fundamental and clinical data suggest that long-term administration of steroids or TNF- α inhibitors

could accelerate AE progression. Thus, same recommendations as for SOT recipients should be
 applied to these patients. Other immunosuppressive therapies were observed in patients with
 accelerated AE, such as rituximab (anti-CD20) [22,29,36], however they are mostly associated with
 steroids or TNF-α inhibitors, which prevent to reliably conclude on their imputability.

191 ALVEOLAR ECHINOCOCCOSIS AND MALIGNANCIES

192 The few reports of AE concomitant to malignancy were compiled in retrospective cohorts. In the 193 French cohort of Chauchet et al., out of the 50 AE/IS cases recorded, 30 (60%) had solid cancer (12 of 194 the digestive tract, 8 of the respiratory tract, 8 urogenital and breast, and 1 of the skin) and 9 (18%) 195 had haematological malignancies (3 myeloproliferative syndrome, 5 lymphoproliferative syndrome, 1 196 Fanconi anaemia) [22]. The median time between onset of immunosuppressive condition (IS) and AE 197 diagnosis was shorter for solid cancers than for other conditions, probably because AE was often 198 diagnosed fortuitously during extensive workup (83%). In the Swiss cohorts of AE/IS, 31/79 (39%) had 199 a malignancy [23,24]. Despite the high number of AE diagnosed in patients with malignancies, no 200 clear evidence of aggressive AE has been reported. On the contrary, these cases often benefited from 201 an earlier management due to fortuitous diagnosis [22].

202 ATYPICAL CASES: PAEDIATRIC CASES, UNUSUAL ORGAN INVOLVMENT

203 Considering that the mean duration of incubation of AE is classically estimated to range between 5 204 and 15 years [2], cases diagnosed in children are exceptional. In an European registry of 559 AE cases 205 diagnosed between 1982 and 2000, 12 (2.1%) were reported in <20 year-old patients, including 4 206 (0.7%) children less than 10 years old [40]. In a retrospective cohort of AE cases from Poland 207 diagnosed between 1990 and 2011, 4/117 cases (3.4%) were children below 11 years of age, and 4 208 others were between 11 and 20 years old [41]. In Asian countries, this prevalence seems a bit higher, 209 as children under 10 year-old account for 2.7% and 7.0% of AE cases in Kyrgyzstan and China, 210 respectively [42,43]. Taken together, 21 paediatric case reports have been described in the literature 211 (median age 12 years), including 24% under 10 years, 38% with extensive lesions (PNM classification

212 with P \geq 3 and/or N/M=1 [21]) and 24% with disseminated lesions [32,38,44–53]. In almost all cases, 213 assessment of immune status was unreported or limited to T CD4 and T CD8 cell counts and HIV 214 serology, at best, and only 2 cases were clearly identified as being immunocompromised: the first 215 was a 6 year-old child co-infected with HIV, as described above [32], and the second was a Turkish 14 216 year-old child with Hyper-IgE Syndrome (HIES) due to STAT3 loss-of-function mutation [38]. This 217 latter case is particularly interesting because STAT3 HIES is known to be associated with defect of the 218 Th17 response, which emphasizes its protective role in AE [54]. It is likely that some rare primary 219 immune disorders (PID), such as those involving the Th1/Th17 response, and probably undescribed 220 ones, might be associated with rapidly progressive AE in paediatric populations. This possibility needs 221 to be explored. In this purpose, apparently-immunocompetent children diagnosed with AE, should be 222 investigated for yet unrecognized PID, especially in case of atypical presentation. This situation 223 should lead to a careful quantitative and qualitative analysis of immune cell populations, a complete 224 workup for autoimmunity, potentially associated with whole-genome sequencing (WGS) analysis to 225 reveal potential underlying causes of immunosuppression. To a lesser extent, the same holds true for 226 unusually extensive and disseminated AE in adult populations [55–57]. However, it should be kept in 227 mind that atypical presentations may be not only related to immune disorders, but can be associated 228 with vascular abnormalities, as illustrated in cases of extrahepatic AE in patients with portal 229 hypertension [58,59], portosystemic shunt [52], or hereditary haemorrhagic telangiectasia [60].

230 ALVEOLAR ECHINOCOCCOSIS DURING PREGNANCY

Pregnancy is associated with major immunological changes, explaining the higher rate of
autoimmune and infectious diseases in pregnant women [61]. Concerning the course of AE in
pregnancy, only few data are available. An animal experiment showed an increased parasite growth
in pregnant mice compared to non-pregnant animals [62]. To our knowledge, only one case of AE in
pregnant woman has been reported so far [63]. The patient presented a secondary lesion in the
brain, possibly related to her pregnancy. Additionally, the French AE National Reference Center

237 reported accelerated course of AE in another pregnant woman who developed lung metastases

discovered by routine check-up after delivery (unpublished observation, personal communication).

239 Whether pregnancy should be considered as accelerating the course of AE remains unclear, however,

as albendazole has a potential for teratogenicity [64,65], this could impact the management of

241 pregnant women with AE.

242 CONCLUSIONS

- 243 Alveolar echinococcosis is an emerging opportunistic infection, favored by alteration of cellular
- immunity. Thus, populations at risk for aggressive AE are those exposed to long-term
- immunosuppressive therapy such as cyclosporin, TNF-α inhibitors, or steroids, or with prolonged and
- severe immune deficiency. While data are scarce regarding other treatments, especially biotherapies,
- 247 physicians should be aware that the use of such drugs could accelerate progression and
- 248 dissemination. Pediatric AE cases, which are highly unusual due to the naturally slow growth rate of
- the parasite, should be thoroughly investigated, as this could reveal rare primary immune
- 250 deficiencies. Implications for management of AE are summarized in Table 4 for each type of immune
- 251 disorder. Overall, the probably most important suggestion would be to think about AE when finding a
- 252 liver lesion.

253
254 Table 4. Proposed implications for management

Population	Specific implications for alveolar echinococcosis management
	Pre-immunosuppression check-up for people living in endemic
Patients with long-term	areas: abdomen imaging (US, CT-scan or MRI), species-specific
immunosuppressive	anti- <i>E. multilocularis</i> serology
therapies ¹	Health education: information about AE and recommendations
	for AE prevention
HIV/AIDS	None
Malignancies	None
Paediatrics	Extensive investigation for primary immune disorder ² or auto-
	immunity ³

- ¹ Especially SOT recipients regimen, TNF- α inhibitors and steroids
- ²Including at least quantification of lymphocyte subsets, assessment of Th1/Th17 cell response, and
- 257 Whole Genome Sequencing when available
- 258 ³ At least autoantibodies against IFN- γ , IFN- α , IL-17/IL-22

259 ACKNOWLEDGMENTS

260 The authors thank Dr Francesca Tamarozzi for helpful discussion.

261 CONFLICT OF INTERESTS

262 None of the authors declares any conflicts of interest.

263 FUNDING

264 No external funding was received for this work.

265 CONTRIBUTION

266 Conceptualization: F.R.-G. Investigation: B.A. Writing-first draft: B.A. Writing-review and editing: all

authors contributed equally.

268 **REFERENCES**

- 269 [1] Bresson-Hadni S, Spahr L, Chappuis F. Hepatic Alveolar Echinococcosis. Semin Liver Dis
 270 2021;41:393–408. https://doi.org/10.1055/s-0041-1730925.
- [2] Gottstein B, Wang J, Boubaker G, Marinova I, Spiliotis M, Müller N, et al. Susceptibility versus
 resistance in alveolar echinococcosis (larval infection with *Echinococcus multilocularis*). Vet
 Parasitol 2015;213:103–9. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.029.
- [3] Vuitton DA, McManus DP, Rogan MT, Romig T, Gottstein B, Naidich A, et al. International
 consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. Parasite 2020;27:41.
- 276 https://doi.org/10.1051/parasite/2020024.
- [4] Vuitton DA, Gottstein B. *Echinococcus multilocularis* and its intermediate host: a model of
 parasite-host interplay. J Biomed Biotechnol 2010;2010:923193.
- 279 https://doi.org/10.1155/2010/923193.
- [5] Knapp J, Lallemand S, Monnien F, Felix S, Valmary-Degano S, Courquet S, et al. Molecular
 diagnosis of alveolar echinococcosis in patients based on frozen and formalin-fixed paraffin embedded tissue samples. Parasite 2022;29:4. https://doi.org/10.1051/parasite/2022004.
- 283 [6] Wang J, Gottstein B. Immunoregulation in larval *Echinococcus multilocularis* infection. Parasite
- 284 Immunol 2016;38:182–92. https://doi.org/10.1111/pim.12292.
- [7] Wang H, Zhang C-S, Fang B-B, Hou J, Li W-D, Li Z-D, et al. Dual Role of Hepatic Macrophages in
 the Establishment of the *Echinococcus multilocularis* Metacestode in Mice. Front Immunol
 2020;11:600635. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.600635.
- 288 [8] Chong S, Chen G, Dang Z, Niu F, Zhang L, Ma H, et al. *Echinococcus multilocularis* drives the
- polarization of macrophages by regulating the RhoA-MAPK signaling pathway and thus affects
 liver fibrosis. Bioengineered 2022;13:8747–58.
- 291 https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2056690.
- [9] Joekel DE, Nur S, Monné Rodriguez J, Kronenberg PA, Kipar A, LeibundGut-Landmann S, et al.
- Agranulocytosis leads to intestinal *Echinococcus multilocularis* oncosphere invasion and hepatic
- 294 metacestode development in naturally resistant Wistar rats. Parasitology 2021;148:53–62.
- 295 https://doi.org/10.1017/S0031182020002012.

- [10] Wang J, Müller S, Lin R, Siffert M, Vuitton DA, Wen H, et al. Depletion of FoxP3+ Tregs improves
 control of larval *Echinococcus multilocularis* infection by promoting co-stimulation and Th1/17
 immunity. Immun Inflamm Dis 2017;5:435–47. https://doi.org/10.1002/iid3.181.
- 299 [11] Wang J, Cardoso R, Marreros N, Müller N, Lundström-Stadelmann B, Siffert M, et al. Foxp3+ T
- 300 Regulatory Cells as a Potential Target for Immunotherapy against Primary Infection with
- 301 *Echinococcus multilocularis* Eggs. Infect Immun 2018;86:e00542-18.
- 302 https://doi.org/10.1128/IAI.00542-18.
- 303 [12] Bellanger A-P, Mougey V, Pallandre J-R, Gbaguidi-Haore H, Godet Y, Millon L. *Echinococcus* 304 *multilocularis* vesicular fluid inhibits activation and proliferation of natural killer cells. Folia
 305 Parasitol 2017;64:2017.029. https://doi.org/10.14411/fp.2017.029.
- [13] Chuanshan Z, Wang H, Jing L, Hou X, Li L, Wang W, et al. Involvement of TIGIT in NK Cell
 Exhaustion and Immune Escape in Patients and Mouse Model with Liver *E. multilocularis*

308 Infection. Hepatol Baltim Md 2021. https://doi.org/10.1002/hep.32035.

- [14] Lechner CJ, Grüner B, Huang X, Hoffmann WH, Kern P, Soboslay PT. Parasite-specific IL-17-type
 cytokine responses and soluble IL-17 receptor levels in Alveolar Echinococcosis patients. Clin
 Dev Immunol 2012;2012:735342. https://doi.org/10.1155/2012/735342.
- 312 [15] Wang J, Vuitton DA, Müller N, Hemphill A, Spiliotis M, Blagosklonov O, et al. Deletion of
- 313 Fibrinogen-like Protein 2 (FGL-2), a Novel CD4+ CD25+ Treg Effector Molecule, Leads to
- 314 Improved Control of *Echinococcus multilocularis* Infection in Mice. PLoS Negl Trop Dis

315 2015;9:e0003755. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003755.

- 316 [16] Yuan M, Song X, Lv W, Xin Q, Wang L, Gao Q, et al. Effect of anacardic acid against
- echinococcosis through inhibition of VEGF-induced angiogenesis. Vet Res 2019;50:3.
- 318 https://doi.org/10.1186/s13567-019-0621-7.
- Tappe D, Frosch M, Sako Y, Itoh S, Grüner B, Reuter S, et al. Close relationship between clinical
 regression and specific serology in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in
 different clinical stages. Am J Trop Med Hyg 2009;80:792–7.

[18] Gottstein B, Lachenmayer A, Beldi G, Wang J, Merkle B, Vu XL, et al. Diagnostic and follow-up
 performance of serological tests for different forms/courses of alveolar echinococcosis. Food
 Waterborne Parasitol 2019;16:e00055. https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00055.

- 325 [19] Kronenberg PA, Deibel A, Gottstein B, Grimm F, Müllhaupt B, Meyer Zu Schwabedissen C, et al.
- 326 Serological Assays for Alveolar and Cystic Echinococcosis-A Comparative Multi-Test Study in
- 327 Switzerland and Kyrgyzstan. Pathog 2022;11:518. https://doi.org/10.3390/pathogens11050518.
- 328 [20] Hotz JF, Peters L, Kapp-Schwörer S, Theis F, Eberhardt N, Essig A, et al. Evaluation of Serological
- 329 Markers in Alveolar Echinococcosis Emphasizing the Correlation of PET-CTI Tracer Uptake with

- 330 RecEm18 and *Echinococcus*-Specific IgG. Pathogens 2022;11:239.
- 331 https://doi.org/10.3390/pathogens11020239.
- 332 [21] Kern P, Wen H, Sato N, Vuitton DA, Gruener B, Shao Y, et al. WHO classification of alveolar
- echinococcosis: Principles and application. Parasitol Int 2006;55:S283–7.
- 334 https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.11.041.
- 335 [22] Chauchet A, Grenouillet F, Knapp J, Richou C, Delabrousse E, Dentan C, et al. Increased
- 336 incidence and characteristics of alveolar echinococcosis in patients with immunosuppression-
- associated conditions. Clin Infect Dis 2014;59:1095–104. https://doi.org/10.1093/cid/ciu520.
- 338 [23] Deibel A, Meyer zu Schwabedissen C, Husmann L, Grimm F, Deplazes P, Reiner CS, et al.
- 339 Characteristics and Clinical Course of Alveolar Echinococcosis in Patients with
- 340 Immunosuppression-Associated Conditions: A Retrospective Cohort Study. Pathogens
- 341 2022;11:441. https://doi.org/10.3390/pathogens11040441.
- 342 [24] Lachenmayer A, Gebbers D, Gottstein B, Candinas D, Beldi G. Elevated incidence of alveolar
- echinococcosis in immunocompromised patients. Food Waterborne Parasitol 2019;16:e00060.
 https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00060.
- 345 [25] Bresson-Hadni S, Franza A, Miguet JP, Vuitton DA, Lenys D, Monnet E, et al. Orthotopic liver
 346 transplantation for incurable alveolar echinococcosis of the liver: report of 17 cases. Hepatol
 347 Baltim Md 1991;13:1061–70.
- 348 [26] Bresson-Hadni S, Miguet JP, Lenys D, Vuitton DA, Viennet G, Becker MC, et al. Recurrence of
 349 alveolar echinococcosis in the liver graft after liver transplantation. Hepatol Baltim Md
 350 1992;16:279–80. https://doi.org/10.1002/hep.1840160146.
- 351[27]Koch S, Bresson-Hadni S, Miguet J-P, Crumbach J-P, Gillet M, Mantion G-A, et al. Experience of352liver transplantation for incurable alveolar echinococcosis: a 45-case European collaborative
- 353 report. Transplantation 2003;75:856–63. https://doi.org/10.1097/01.TP.0000054230.63568.79.
- 354 [28] Dupont C, Grenouillet F, Mabrut J-Y, Gay F, Persat F, Wallon M, et al. Fast-Growing Alveolar
- 355 Echinococcosis Following Lung Transplantation. Pathog 2020;9:E756.
- 356 https://doi.org/10.3390/pathogens9090756.
- 357 [29] Geyer M, Wilpert J, Wiech T, Theilacker C, Stubanus M, Kramer-Zucker A, et al. Rapidly
- 358 progressive hepatic alveolar echinococcosis in an ABO-incompatible renal transplant recipient.
- 359 Transpl Infect Dis 2011;13:278–84. https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2010.00583.x.
- 360 [30] Dražilová S, Kinčeková J, Beňa Ľ, Zachar M, Švajdler M, Zavacký P, et al. Alveolar echinococcosis
- 361 in patient after cadaveric kidney transplantation. Helminthologia 2011;48:229–36.
- 362 https://doi.org/10.2478/s11687-011-0032-4.

- 363 [31] Houston S, Belga S, Buttenschoen K, Cooper R, Girgis S, Gottstein B, et al. Epidemiological and
- 364 Clinical Characteristics of Alveolar Echinococcosis: An Emerging Infectious Disease in Alberta,
- 365 Canada. Am J Trop Med Hyg 2021;104:1863–9. https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1577.
- 366 [32] Sailer M, Soelder B, Allerberger F, Zaknun D, Feichtinger H, Gottstein B. Alveolar echinococcosis
- 367 of the liver in a six-year-old girl with acquired immunodeficiency syndrome. J Pediatr

368 1997;130:320–3. https://doi.org/10.1016/s0022-3476(97)70364-0.

- 369 [33] Zingg W, Renner-Schneiter EC, Pauli-Magnus C, Renner EL, van Overbeck J, Schläpfer E, et al.
- 370 Alveolar echinococcosis of the liver in an adult with human immunodeficiency virus type-1
- 371 infection. Infection 2004;32:299–302. https://doi.org/10.1007/s15010-004-3134-9.
- 372 [34] Diem S, Gottstein B, Beldi G, Semmo N, Diem LF. Accelerated Course of Alveolar Echinococcosis
- 373 After Treatment With Steroids in a Patient With Autoimmune Encephalitis. Cureus
- 374 2021;13:e18831. https://doi.org/10.7759/cureus.18831.
- 375 [35] Weiner SM, Krenn V, Koelbel C, Hoffmann HG, Hinkeldey K, Ockert D. Echinococcus
- 376 *multilocularis* infection and TNF inhibitor treatment in a patient with rheumatoid arthritis.
- 377 Rheumatol Int 2011;31:1399–400. https://doi.org/10.1007/s00296-010-1570-7.
- 378 [36] Dentan C, Mazet R, Gilson M, Marchou-Lopez S, Gaudin P. Rheumatoid arthritis, alveolar
 379 echinococcosis, and rituximab: A case report. Joint Bone Spine 2012;79:325–7.
- 380 https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2011.10.014.
- [37] Reuter S, Buck A, Grebe O, Nüssle-Kügele K, Kern P, Manfras BJ. Salvage Treatment with
- 382 Amphotericin B in Progressive Human Alveolar Echinococcosis. Antimicrob Agents Chemother

383 2003;47:3586–91. https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3586-3591.2003.

- [38] Haskologlu S, Dogu F, Gollu Bahadır G, Akyuzluer S, Ciftci E, Altun D, et al. An Unexpected
 Infection in Loss-of-Function Mutations in STAT3: Malignant Alveolar Echinococcosis in Liver.
- 386 Iran J Allergy Asthma Immunol 2020;19:667–75. https://doi.org/10.18502/ijaai.v19i6.4936.
- 387 [39] Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. Autoimmun Rev

388 2003;2:119–25. https://doi.org/10.1016/S1568-9972(03)00006-5.

389 [40] Kern P, Bardonnet K, Renner E, Auer H, Pawlowski Z, Ammann RW, et al. European

- echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. Emerg Infect Dis
 2003;9:343–9. https://doi.org/10.3201/eid0903.020341.
- 392 [41] Nahorski WL, Knap JP, Pawłowski ZS, Krawczyk M, Polański J, Stefaniak J, et al. Human alveolar
- echinococcosis in Poland: 1990-2011. PLoS Negl Trop Dis 2013;7:e1986.

394 https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001986.

Isubalieva J, Minbaeva G, Ziadinov I, Deplazes P, Torgerson PR. Human Alveolar Echinococcosis
 in Kyrgyzstan. Emerg Infect Dis 2013;19:1095–7. https://doi.org/10.3201/eid1907.121405.

- 397 [43] Zheng C, Xue C, Han S, Li Z, Wang H, Wang L, et al. National Alveolar Echinococcosis Distribution
- 398 China, 2012–2016. China CDC Wkly 2020;2:1–7.
- 399 [44] Jonaitytė E, Judickas M, Tamulevičienė E, Šeškutė M. Alveolar Echinococcosis in Children. Case
 400 Rep Pediatr 2020;2020:5101234. https://doi.org/10.1155/2020/5101234.
- 401 [45] Kinčeková J, Hrčková G, Bober J, Vrzgula A, Szabadošová V, Bohuš P, et al. A rare case of
- 402 alveolar echinococcosis in a 14-year-old child. Helminthologia 2008;45:28–31.
- 403 https://doi.org/10.2478/s11687-008-0005-4.
- 404 [46] Honda S, Okada T, Sasaki F, Naito S, Sato N, Kamiyama T, et al. Pediatric alveolar echinococcosis
 405 invading the diaphragm and spreading to the chest and abdominal wall. J Pediatr Surg
 406 2010;45:e13-16. https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2009.11.018.
- 407 [47] Yoshida T, Kamiyama T, Okada T, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, et al. Alveolar
- 408 echinococcosis of the liver in children. J Hepato-Biliary-Pancreat Sci 2010;17:152–7.
- 409 https://doi.org/10.1007/s00534-009-0114-6.
- 410 [48] Oral A, Ozturk G, Aydinli B, Kantarci M, Salman AB. An unusual presentation of alveolar
- 411 echinococcosis in a 12-yr-old immunocompetent child. Pediatr Transplant 2012;16:E375-378.
- 412 https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2012.01735.x.
- 413 [49] Guinet C, Guiot E, De Miscault G, Galloy M-A, Rivier A, Petit C, et al. L'échinococcose alvéolaire
- 414 hépatique : une cause exceptionnelle de douleurs abdominales récurrentes, chirurgicalement
- 415 curable, chez l'enfant. Arch Pédiatrie 2012;19:1200–4.
- 416 https://doi.org/10.1016/j.arcped.2012.08.013.
- 417 [50] Kantarci M, Bayraktutan U, Pirimoglu B, Ogul H, Oral A, Eren S, et al. Multisystem involvement
- 418 of alveolar echinococcosis in a child. J Infect Dev Ctries 2014;8:1494–7.
- 419 https://doi.org/10.3855/jidc.4214.
- 420 [51] Mack I, Wildhaber B, Vassen V, Ritz N. Alveolar echinococcosis in the liver of an adolescent boy.
- 421 Arch Dis Child 2019;104:407. https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-314990.
- 422 [52] Joyce J, He X-O, Rozovsky K, Stefanovici C, Fanella S. Disseminated *Echinococcus multilocularis*
- 423 Infection without Liver Involvement in Child, Canada, 2018. Emerg Infect Dis 2020;26:1856–9.
- 424 https://doi.org/10.3201/eid2608.191644.
- 425 [53] Yilmaz-Cankaya B, Pirimoglu B. Hepatic alveolar echinococcosis in a child. Rev Soc Bras Med
 426 Trop n.d.;54:e0487-2020. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0487-2020.
- 427 [54] Cifaldi C, Ursu GM, D'Alba I, Paccoud O, Danion F, Lanternier F, et al. Main human inborn errors
- 428 of immunity leading to fungal infections. Clin Microbiol Infect 2022.
- 429 https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.06.031.

- 430 [55] Caire Nail L, Rodríguez Reimundes E, Weibel Galluzzo C, Lebowitz D, Ibrahim YL, Lobrinus JA, et
- 431 al. Disseminated alveolar echinococcosis resembling metastatic malignancy: a case report. J
 432 Med Case Reports 2017;11:113. https://doi.org/10.1186/s13256-017-1279-2.
- 433 [56] Batçık OE, Öğrenci A, Koban O, Ekşi MŞ, Bilge T. Cerebral Alveolar Echinococcosis Concomitant
- with Liver and Lung Lesions in a Young Adult Patient: Case Report and Literature Review. Turk
 Parazitolojii Derg 2016;40:169–71. https://doi.org/10.5152/tpd.2016.4624.
- 436 [57] Xu L, Siyiti S, Song X, Wen H, Ding L, Yunus A, et al. Recurrent multiple-organ involvement of
- 437 disseminated alveolar echinococcosis in 3 patients: Case report. Medicine (Baltimore)
- 438 2017;96:e7632. https://doi.org/10.1097/MD.00000000007632.
- 439 [58] Reuter S, Seitz HM, Kern P, Junghanss T. Extrahepatic Alveolar Echinococcosis without Liver
- 440 Involvement: a Rare Manifestation. Infection 2000;28:187–92.
- 441 https://doi.org/10.1007/s150100050079.
- 442 [59] Faucher J-F, Descotes-Genon C, Hoen B, Godard J, Félix S, Aubry S, et al. Hints for control of
- infection in unique extrahepatic vertebral alveolar echinococcosis. Infection 2017;45:365–8.
 https://doi.org/10.1007/s15010-016-0974-z.
- [60] Baldolli A, Bonhomme J, Yera H, Grenouillet F, Chapon F, Barbier C, et al. Isolated Cerebral
 Alveolar Echinococcosis. Open Forum Infect Dis 2019;6:ofy349.
- 447 https://doi.org/10.1093/ofid/ofy349.
- 448 [61] Poole JA, Claman HN. Immunology of pregnancy. Clin Rev Allergy Immunol 2004;26:161–70.
 449 https://doi.org/10.1385/CRIAI:26:3:161.
- 450 [62] Antolová D, Reiterová K. Influence of *Echinococcus multilocularis* infection on reproduction and
- 451 cellular immune response of mice. Parasite Immunol 2010;32:384–7.
- 452 https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01194.x.
- 453 [63] Yang YR, Vuitton DA, Jones MK, Craig PS, McManus DP. Brain metastasis of alveolar
- 454 echinococcosis in a hyperendemic focus of *Echinococcus multilocularis* infection. Trans R Soc

```
455 Trop Med Hyg 2005;99:937–41. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.04.020.
```

456 [64] Carlsson G, Patring J, Ullerås E, Oskarsson A. Developmental toxicity of albendazole and its

- 457 three main metabolites in zebrafish embryos. Reprod Toxicol Elmsford N 2011;32:129–37.
- 458 https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.05.015.
- 459 [65] Eckardt K, Kaltenhäuser J, Kilb C, Seiler A, Stahlmann R. Relative potency of albendazole and its
- 460 sulfoxide metabolite in two in vitro tests for developmental toxicity: the rat whole embryo
- 461 culture and the mouse embryonic stem cell test. Reprod Toxicol Elmsford N 2012;34:378–84.
- 462 https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.037.

463

Figure 1. Fortuitous imaging of liver alveolar echinococcosis.

Injected abdominal CT (axial view, venous phase) performed for an acute sigmoïditis episode in a 65 year old woman. She received a kidney transplant 9 years ago and was treated with tacrolimus and mycophenolate mofetil. Punctiform calcifications in the center of 2 small anterior lesions (thin arrows). The largest posterior lesion invades the left and median hepatic veins (thick arrows).

Source: Division of Tropical and Humanitarian Medicine, University Hospitals of Geneva, Switzerland.





Titre : Physiopathologie de l'échinococcose alvéolaire : IL-33 et pistes thérapeutiques

Mots clés : échinococcose alvéolaire, *Echinococcus multilocularis*, immunologie, Treg, angiogénèse, nanoparticules

Résumé : L'échinococcose alvéolaire (EA) est une maladie sévère due à l'infection par la forme larvaire d'Echinococcus multilocularis, appelée métacestode. Au cours de l'EA, le métacestode se développe dans le foie où une réponse initiale Th1/Th17 peut conduire à son élimination chez les individus résistants. Chez les individus sensibles, une réponse Th2 se met en place plus tardivement, conduisant à la tolérance au parasite. Le rôle de l'IL-33, une alarmine libérée durant la nécrose et connue pour orienter l'immunité vers une réponse Th2, n'a pas encore été décrite dans l'EA. Dans un modèle murin d'EA péritonéale, l'IL-33 était associée à une accélération de la croissance parasitaire possiblement due à la polarisation des macrophages en M2 tolérogènes et à la libération de cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et TGF-β1.

L'IL-33 est une alarmine clé dans la physiopathologie de l'EA qui médie l'effet tolérogène de la réponse systémique Th2. Il existe un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la prise en charge de l'EA, pour laquelle il n'y a pas de chimiothérapie curative. Nous avons formulé des nanoparticules de PLGA-PEG-COOH chargée de méfloquine (NP-méf), un composé hautement actif in vitro contre E. multilocularis mais insuffisamment in vivo. Les NP-méf étaient stables au moins 7 jours, et capables de traverser la couche externe acellulaire du métacestode en moins de 5 min, et ainsi d'atteindre la couche germinale qui contient les cellules vivantes. Les NP-méf sont de bons candidats pour le traitement de l'EA, car elles peuvent délivrer ce composé hautement actif directement dans le parasite.

Title : Pathophysiology of alveolar echinococcosis: IL-33 and new therapeutic strategies

Keywords: alveolar echinococcosis, *Echinococcus multilocularis*, immunology, Treg, angiogenesis, nanoparticles

Abstract: Alveolar echinococcosis (AE) is a severe disease due to the infection with the E. multilocularis larval stage, so-called metacestode. During AE, the metacestode develops in the liver where the initial Th1/Th17 response can lead to its clearance in resistant patients. In susceptible patients, a Th2 response initiate later, leading to tolerance to the parasite. The role of IL-33, an alarmin released during necrosis and known to drive immunity toward a Th2 phenotype, has not been described yet in AE. In a mouse model of peritoneal AE, IL-33 was associated with an acceleration of the parasite growth, possibly due to macrophage polarization into tolerogenic M2, and to release of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and TGF-B1.

IL-33 is a key alarmin in AE pathophysiology which mediates the tolerogenic effect of systemic Th2 response.

There is an urgent need for new therapeutic strategies in AE management, for which there is no curative chemotherapy. We developed PLGA-PEG-COOH nanoparticles loaded with mefloquine (mef-NP), which is a compound highly active *in vitro* bu poorly *in vivo* against *E. multilocularis*. Mef-NP were stable at least 7 days and they could cross the outer acellular layer of the metacestode in less than 5 min, reaching the germinal layer which contains the living cells. Mef-NP are good candidates for treatment of AE, because they can deliver this highly active compound directly into the parasite.