



HAL
open science

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

PU-PH, Université Jean Monnet (Saint-Etienne)
CR, INRAE/Université de Tours

Composition du Jury :

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

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

Dir. de thèse : Florence Robert-Gangneux
Co-dir. de thèse : Sarah Dion

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 Raguene-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-du-commun 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
Liste des figures.....	6
Liste des tableaux.....	6
Revue de la littérature.....	7
I. <i>Echinococcus multilocularis</i> , agent de l'échinococcose alvéolaire.....	8
A. Systématique.....	8
B. Cycle parasitaire.....	8
C. Epidémiologie.....	10
D. Présentation clinique.....	11
E. Démarche diagnostique.....	11
F. Prise en charge thérapeutique.....	13
II. Réponse immune lors d'une échinococcose alvéolaire.....	13
A. Modèles expérimentaux animaux.....	13
B. Lors de l'invasion.....	15
C. Phase précoce.....	16
D. Phase tardive.....	18
E. Sensibilité et résistance à l'infection.....	22
F. Immunomodulation par <i>Echinococcus multilocularis</i>	25
III. L'alarmine IL-33.....	27
A. Structure et sources.....	27
B. Le récepteur ST2.....	29
C. Principales populations cibles.....	30
1. Les lymphocytes Th2.....	30
2. Les lymphocytes T _{reg}	30
3. Les cellules lymphoïdes innées.....	31
4. Les mastocytes.....	33
5. Les monocytes-macrophages.....	33

6. Les polynucléaires	34
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
A. Méthodes d'évaluation des composés antiparasitaires.....	37
1. Approches <i>in vitro</i>	37
2. Approches <i>in vivo</i>	40
B. Antiparasitaires conventionnels.....	41
C. Traitement de sauvetage : amphotéricine B.....	42
D. Autres molécules évaluées.....	43
E. Nouvelles formulations thérapeutiques.....	46
Axe 1 : rôle de l'IL-33 dans l'échinococcose alvéolaire	50
I. Contexte et objectifs	51
II. Résumé	51
III. Article.....	52
Axe 2 : nouvelles pistes thérapeutiques dans l'échinococcose alvéolaire.....	95
I. Contexte et objectifs	96
II. Résumé	97
III. Article (en préparation).....	97
Perspectives et conclusions.....	125
Références.....	131
Annexe.....	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 résonance 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 Dinucléotide

NK : *Natural Killer*

NO : 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' <i>Echinococcus multilocularis</i> et <i>Echinococcus granulosus</i> 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. 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 <i>Echinococcus multilocularis</i>	26
Tableau III. Caractéristiques des différentes cellules lymphoïdes innées.	32
Tableau IV. Comparaison des méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité anti- <i>E. multilocularis</i>	40
Tableau V. Autres composés évalués contre les formes larvaires d' <i>Echinococcus multilocularis</i>	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, super-embranchement 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).

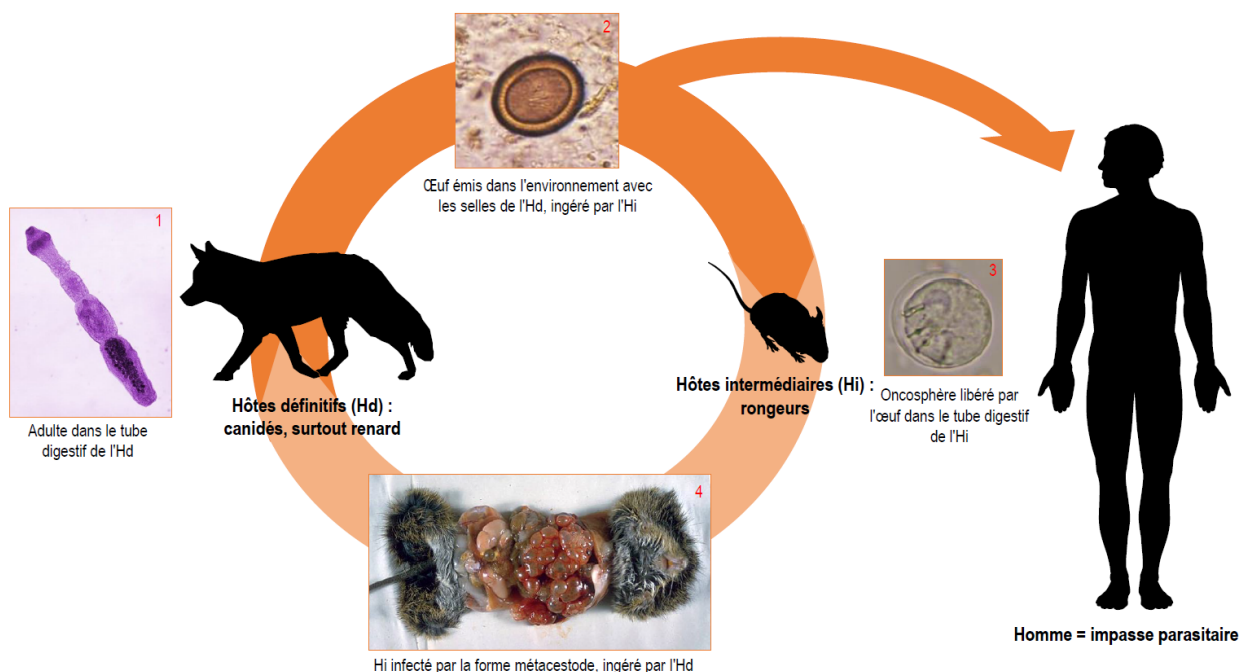


Figure 1. Cycle d'*Echinococcus multilocularis*.

Illustrations : ^{1,2,4} <https://phil.cdc.gov/>, Domaine public, ¹ #22124, ² #18949, ⁴ #335. ³ Wikimedia Common, [attribution CC BY 2.5, lien](#), 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 hexacante 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 parasites 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).

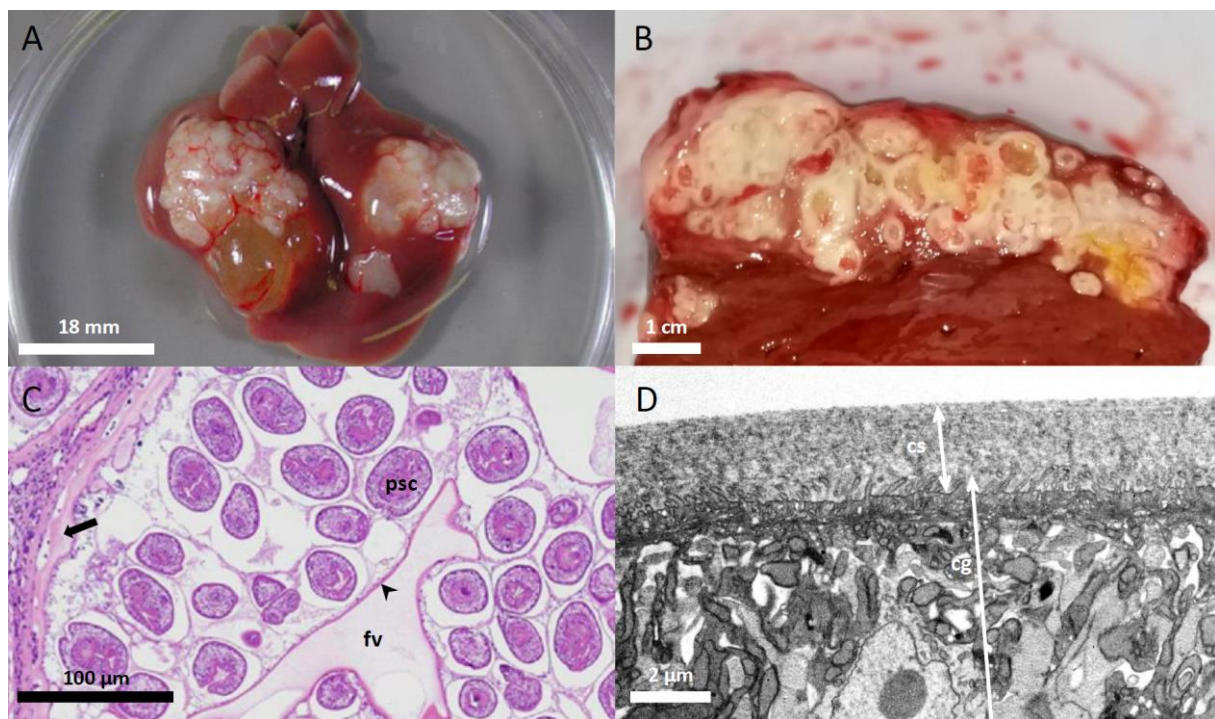


Figure 2. Morphologie des métacestodes d'*Echinococcus multilocularis*.

(A) Foie de gerbille (*Meriones unguiculatus*) atteint d'EA, extrait de [12]. (B) Section de foie humain infecté par *E. multilocularis*, Service de Parasitologie-Mycoologie, 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 issues de la couche germinative, incluses 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 dévagent 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. Épidémiologie

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 dessiccation, et les hôtes intermédiaires infectés par *E. multilocularis* ont une vie trop courte pour permettre la reprise du cycle par la suite [16].

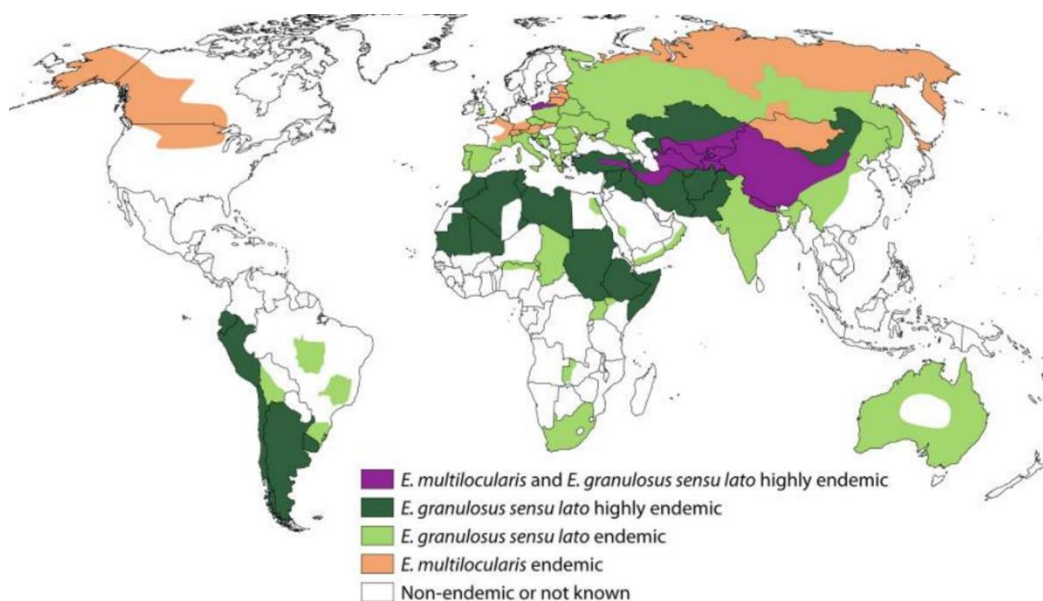


Figure 3. Distribution d'*Echinococcus multilocularis* et *Echinococcus granulosus* dans le monde.

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.

Hd hôte définitif, Hi hôte intermédiaire.

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

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 métacystode 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 métacystode, 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 métacystode 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 C57Bl/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 β2-m^{-/-} (déficit en lymphocytes T CD8⁺), TCR-β^{-/-} (déficit en lymphocytes T CD4⁺ αβ) et μMT (déficit en lymphocytes B), a mis en évidence que la formation de ces granulomes était dépendante des lymphocytes T CD4⁺ αβ et qu'elle permettait, au moins partiellement, de limiter le développement des lésions parasitaires [43].

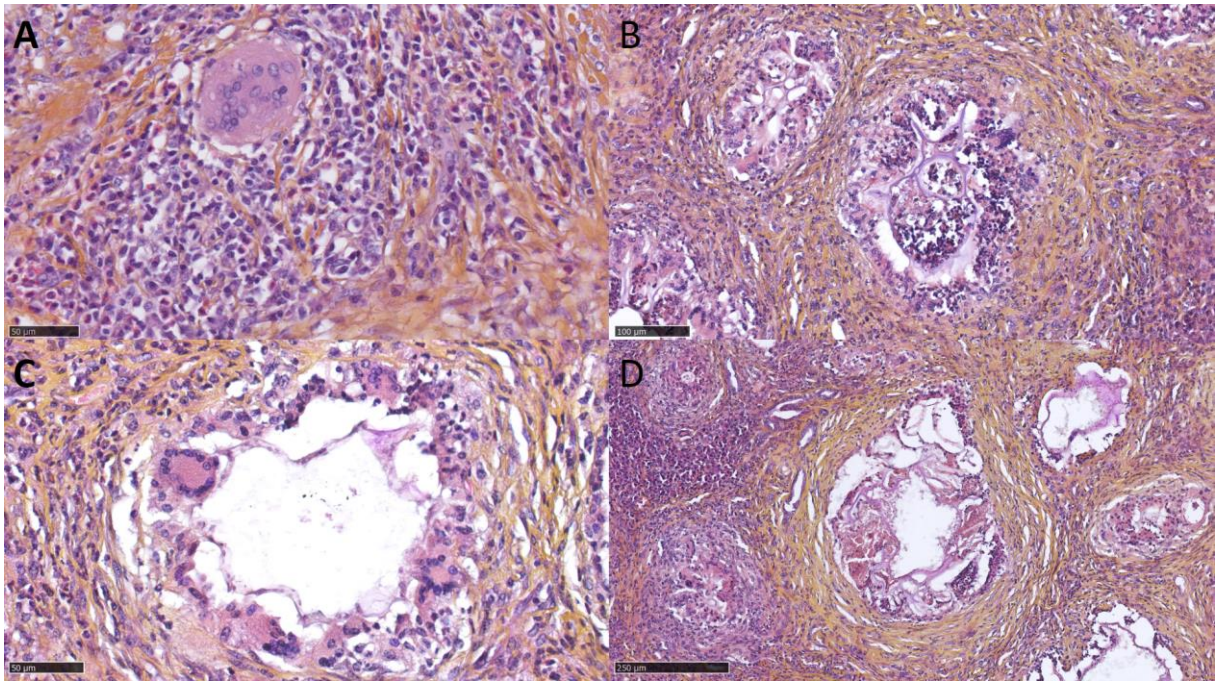


Figure 5. Coupes histologiques de lésions murines précoces, coloration à l'hématoxyline et éosine.

(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 caséuse 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 pro-inflammatoires et dont les capacités antimicrobiennes et antitumorales sont accrues (production d'espèces réactives de l'oxygène et de NO). L'IL-12, l'IFN- γ 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 « T_{reg} » [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 chimio-induite, 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 , lui-même 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].

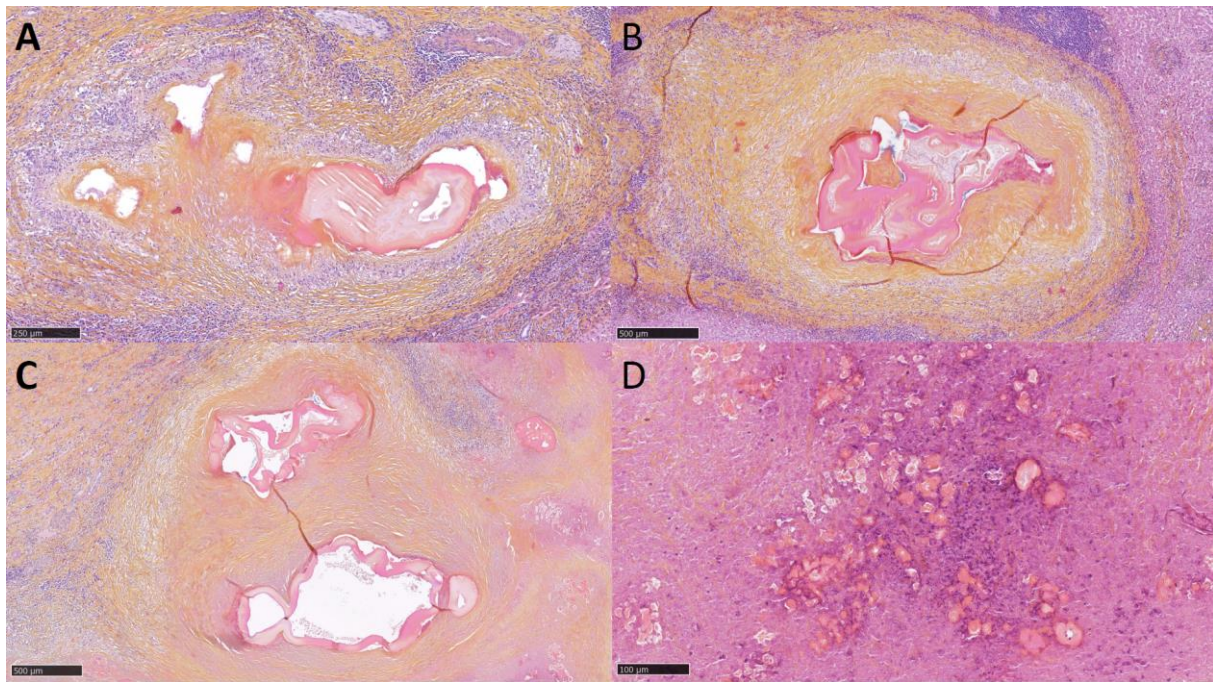


Figure 6. Coupes histologiques de lésions humaines tardives, coloration à l'hématoxyline et éosine.

(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 caséuse 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.

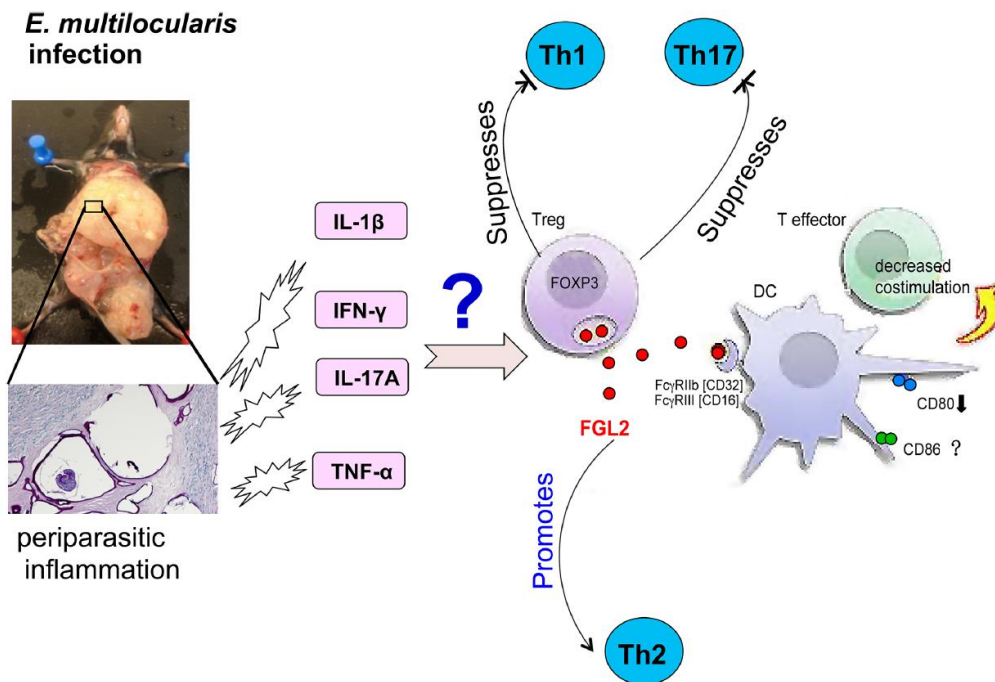


Figure 7. Schéma explicatif du mécanisme d'action hypothétique de FGL2.

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/EBP β , AP-1 et NF- κ B), 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 pro-

myéloïde 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 plus résistants, comme les C57Bl/10 et les A/J, a permis de mettre en évidence chez ces dernières une 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, phytohématagglutinine) 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.

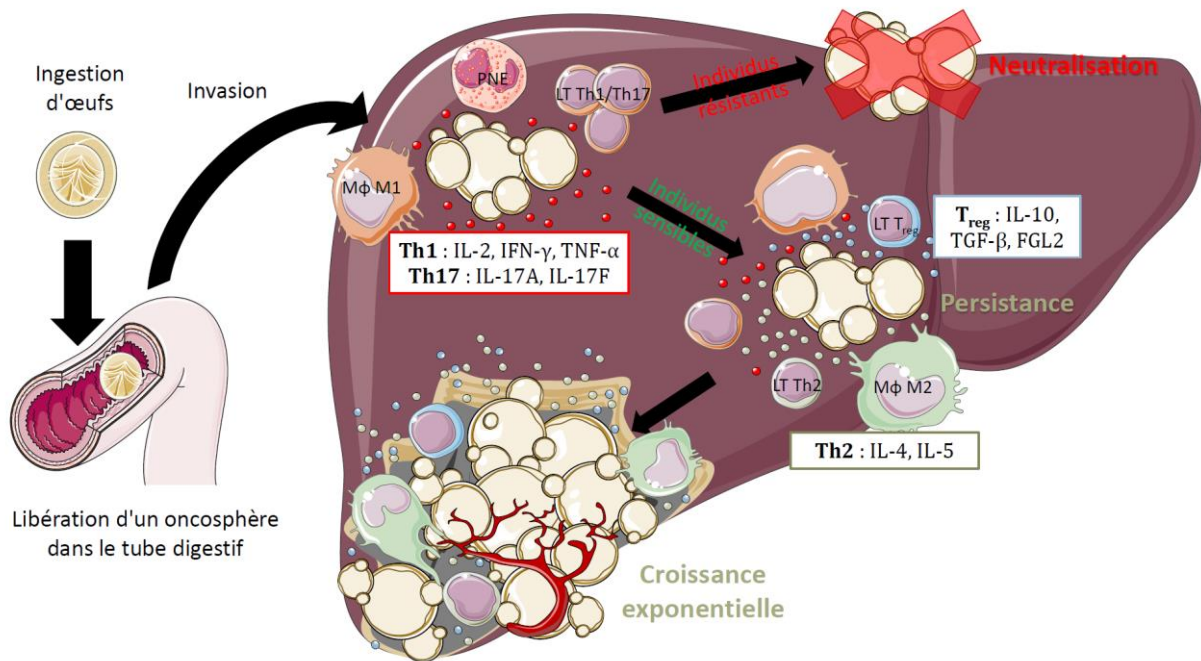


Figure 8. Schéma récapitulatif de la réponse immunitaire au cours de l'échinococcose alvéolaire.

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 pro-inflammatoires M1 (Mφ 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].

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

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

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].

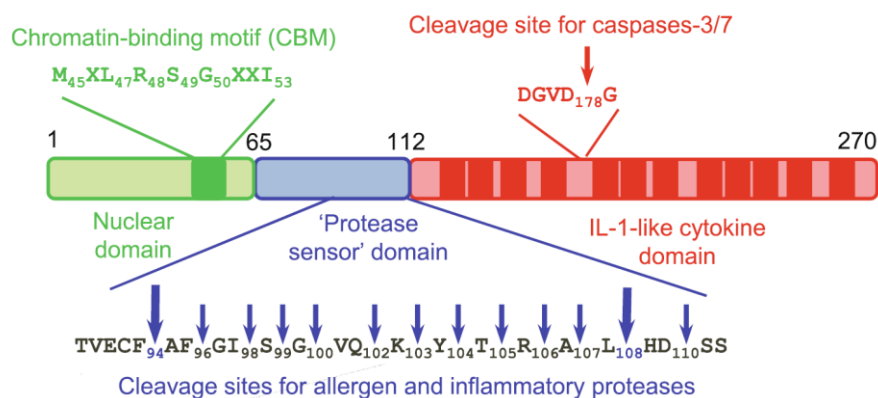


Figure 9. Structure de l'IL-33.

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, inducible 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(s) 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].

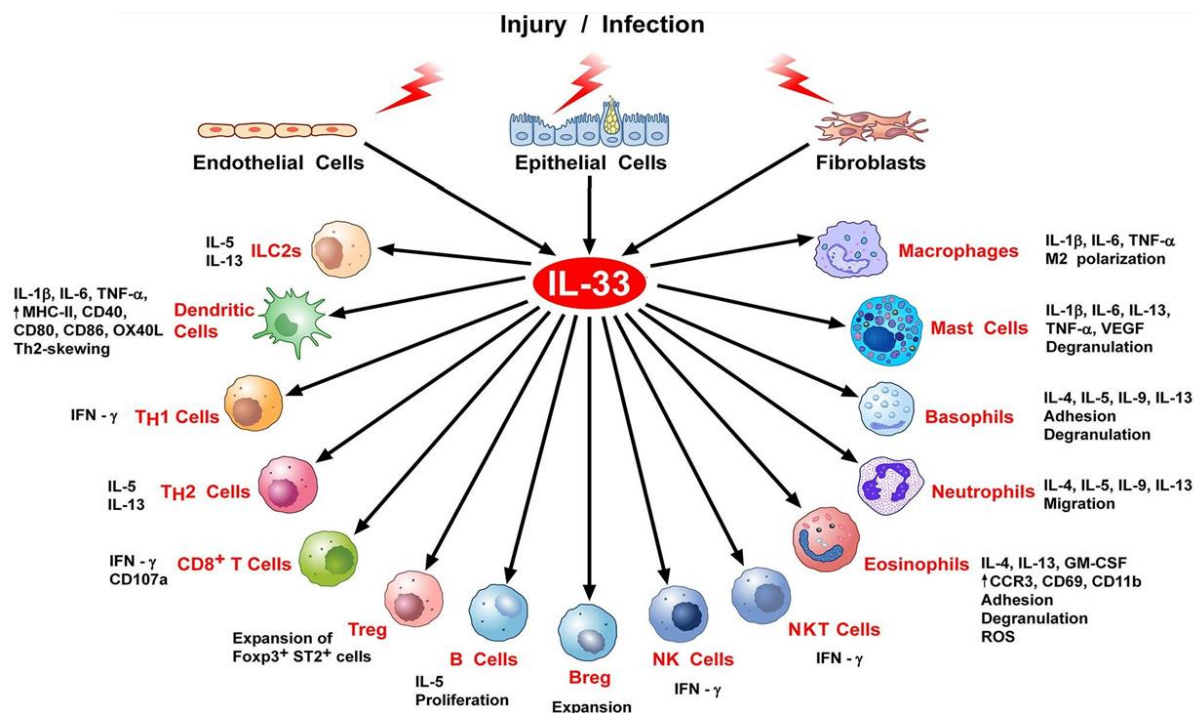


Figure 10. Multiples cibles de l'IL-33.

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- κ B 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].

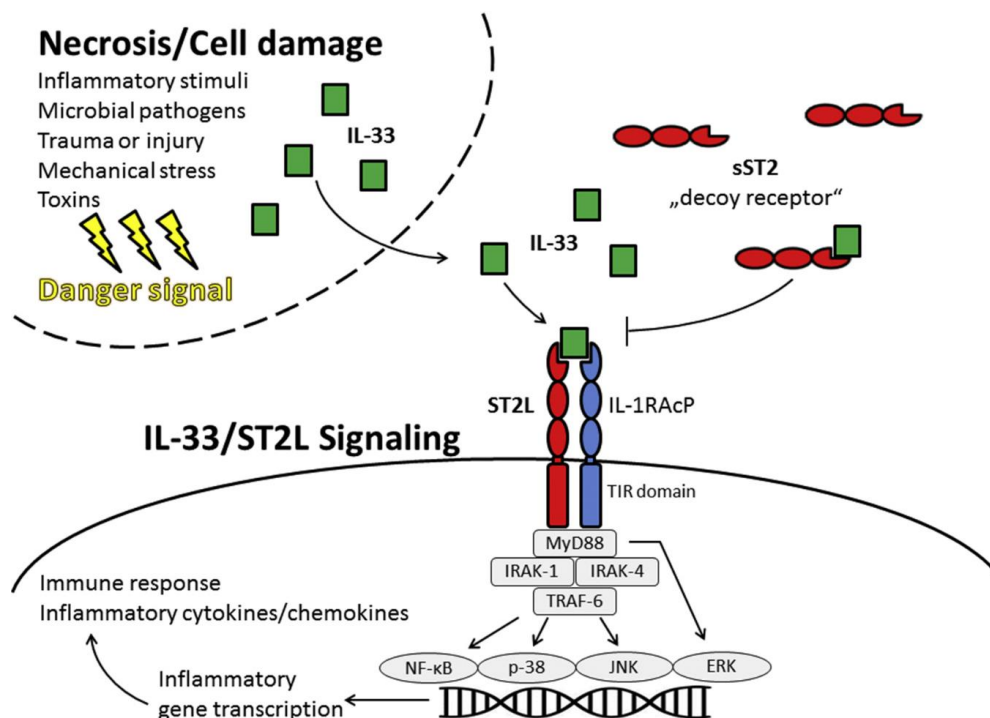


Figure 11. Représentation de sST2 et de la voie de signalisation de l'axe IL-33/ST2L.

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, ceux-ci 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, RORγt 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⁺ROR γ t⁺ 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 γ δ 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 ROR γ t et produisent de 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, ROR α	IL-25, IL-33, TSLP	IL-4, IL-5, IL-13, IL-9, amphiréguline	Immunité : helminthes, réparation tissulaire, homéostasie
ILC3	ROR γ t	IL-1 β , IL-23	IL-17A, IL-22	Immunité : bactéries extracellulaires, tolérance au microbiote
LTi	ROR γ t	IL-1 β , 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 T_{reg} [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, l'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 FcεRI (hypersensibilité de type I), voie historiquement décrite, mais également par les complexes immuns et leur fixation au FcγRI, 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 FcεRI [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-1β 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⁺RORγt⁺, 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 elle-même 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 naphthalène, 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 Fc ϵ RI, 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 FcεRI 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 auto-immunes, 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- β 1 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].

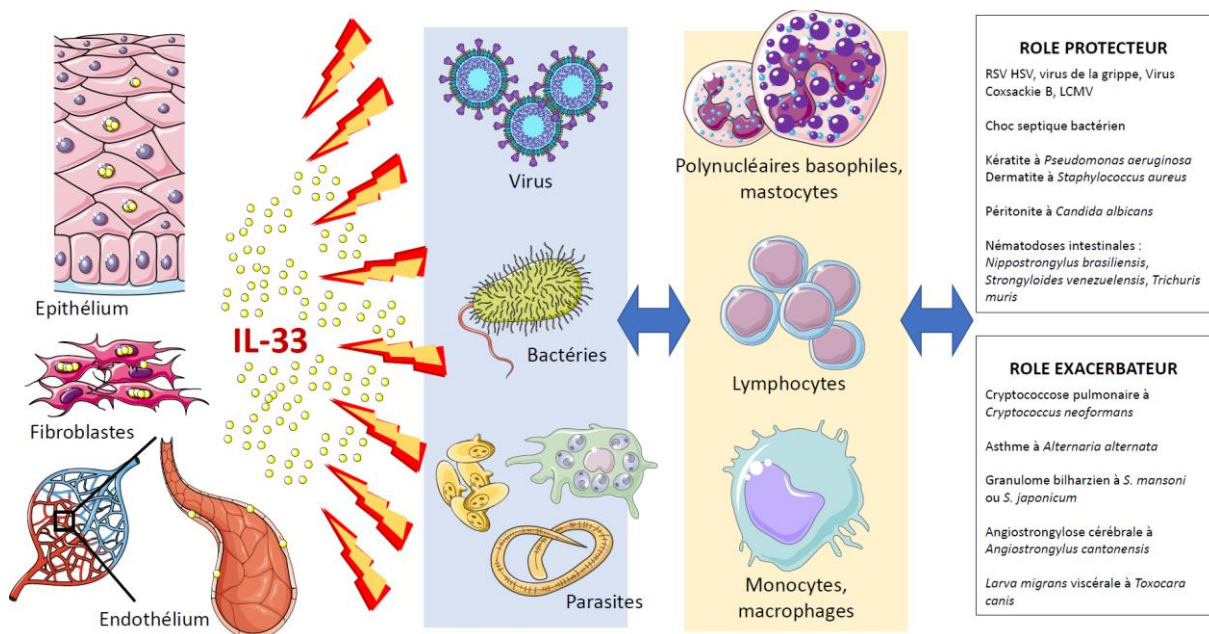


Figure 12. Les rôles multiples de l'IL-33 au cours des maladies infectieuses.

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 Vetsuisse 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 structure-activité [312]. Il s'agit de la méthode *in vitro* à détection objective la plus utilisée dans la littérature (Tableau IV).

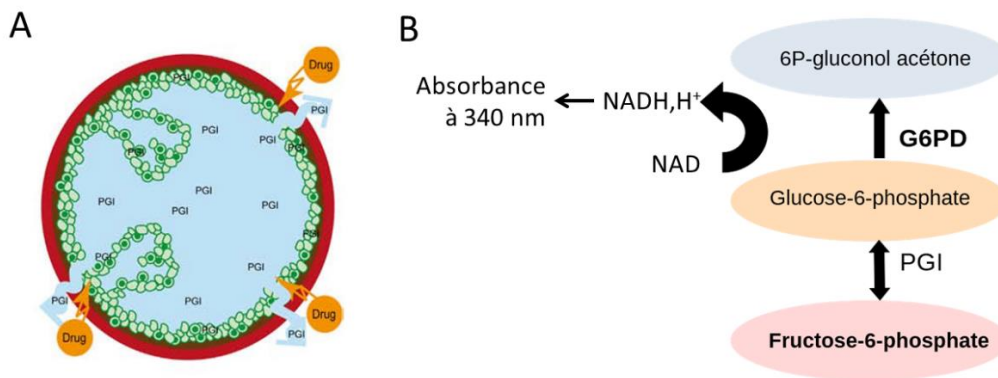


Figure 13. Schéma explicatif du test de la phosphoglucose isomérase.

(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 résosfurine 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 résosfurine 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.

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

Méthode d'évaluation	Stade employé	Technique de mesure	Normalisation du résultat	Références
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]

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 prise en charge actuelle de l'EA repose sur l'exérèse chirurgicale de la lésion, actuellement seule méthode curative, associée à une chimioprophylaxie pré- et post-chirurgicale 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 parasitocides : 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 alopecie, et surtout une hépatotoxicité prenant généralement la forme d'une hépatite cytolitique immuno-induite, à risque de récurrence 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 montré 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*.

Molécule	Tests d'évaluation <i>in vitro</i>	Modèle d'évaluation <i>in vivo</i>	Conclusion	Référence
Anti-infectieux				
DB1127 (dérivé dicationique de pentamidine)	PGI	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (CE ₅₀ =6,1 μM) et <i>in vivo</i> par voie IP (=ABZ) mais pas <i>per os</i>	[340,341]
Buparvaquone	PGI et résazurine	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (CE ₅₀ =2,9 μM) mais pas <i>in vivo</i>	[346]
Atovaquone	Viabilité de PSC	Primaire hépatique	Actif <i>in vitro</i> (50 μM) et <i>in vivo</i> (<ABZ)	[328,329]
MMV665807	PGI et résazurine, viabilité de CPCG	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (CE ₅₀ =1,2 μM) mais pas <i>in vivo</i>	[318]
Clarithromycine	Viabilité de métacestodes	Non réalisé	Actif <i>in vitro</i> (13 μM)	[336]
Artésunate et dihydroartémisinine	EmAP	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (40 μM) et <i>in vivo</i> seulement en synergie avec l'ABZ	[345]
Itraconazole			Actif <i>in vitro</i> (1 mM)	
Artéméther, caspofungine, miltefosine, rifampicine, cotrimoxazole	Viabilité de métacestodes	Non réalisé	Inactifs <i>in vitro</i>	[335]
Inhibiteurs de protéase du VIH	Viabilité de métacestodes et de PSC	Secondaire péritonéal	Nelfinavir actif <i>in vitro</i> (CE ₅₀ =29 μM) et <i>in vivo</i> (=ABZ)	[330]

Antinéoplasiques

Nilotinib, everolimus	PGI	Secondaire sous-cutané	Actif <i>in vitro</i> (nilotinib CE ₅₀ =77 µM, everolimus CE ₅₀ =33 µM) mais pas <i>in vivo</i>	[343]
Imatinib	Morphologie de métacestodes, viabilité de CPCG et de PSC	Non réalisé	Actif <i>in vitro</i> (25 µM)	[307]
Afatinib, U0126	Morphologie de métacestodes, viabilité de PSC	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (10 µM afatinib, 200 µM U0126) et <i>in vivo</i> (=ABZ)	[326]
BI 2536	Viabilité de CPCG	Non réalisé	Actif <i>in vitro</i> (10 nM)	[334]
Vincristine, navelbine, méthotrexate	Viabilité de métacestodes (inoculation)	Non réalisé	Vincristine et navelbine actifs <i>in vitro</i> (0,1-60 nM), méthotrexate favorise la croissance parasitaire	[376]
Docetaxel, paclitaxel, doxorubicine, vorinostat, navelbine	Viabilité de métacestodes (inoculation)	Non réalisé	Docetaxel (2-10 µM) et paclitaxel (2-10 µM) actifs <i>in vitro</i>	[377]
Bortézomib	PGI	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (CE ₅₀ =0,6 µM) mais pas <i>in vivo</i>	[344]
Inhibiteurs de PIM kinases : SGI-1776, CX-6258	Morphologie de métacestodes, viabilité de CPCG	Non réalisé	Actif <i>in vitro</i> (10 µM)	[337]
2-méthoxyestradiol	Exposition de métacestodes et RT- qPCR <i>Em14-3-3</i>	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (5 µM) mais pas <i>in vivo</i>	[321]
2-désoxy-D-glucose	EmAP	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (80 µM) et <i>in vivo</i> (=ABZ)	[317]
3-bromopyruvate	EmAP	Secondaire péritonéal	Actif <i>in vitro</i> (40 µM) et <i>in vivo</i> (=ABZ)	[315]
Lonidamine	EmAP	Non réalisé	Actif <i>in vitro</i> (40 µM)	[378]

Composés extraits de plantes				
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 vivo</i> (=ABZ)	[380,381]
Carvacrol	Viabilité de métacestodes	Secondaire péritonéal	Potentiaise 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]
Autres				
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 <i>in vitro</i> (CE ₅₀ =0,2-1,7 µM)	[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 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 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 phosphoglucose 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 nanothérapie 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].

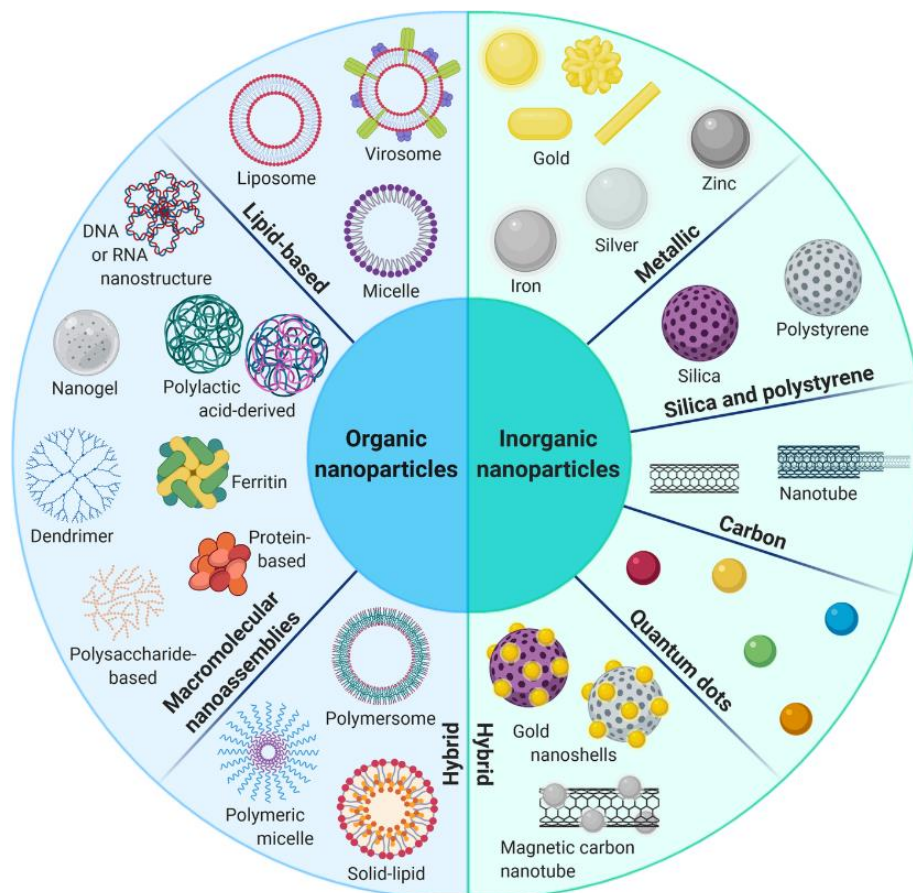


Figure 14. Représentation schématique des types de nanoparticules.

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 nanoparticules	Tolérance	Stabilité	Coût	Utilisations actuellement validées par la FDA
	Liposomes				
	Nanocapsules				
Lipidiques	Nanoparticules lipidiques solides	+++	+/-	+/**	Vectorisation de principes actifs
	Emulsions				
	Micelles polymériques				
Polymériques	Polymersomes	++	++	+/**	Vectorisation de principes actifs
	Nanosphères				
	Dendrimères				
	Or				Vectorisation de principes actifs
Inorganiques	Fer	+/-	+++	+++	Supplémentation en fer
	Silice				Imagerie médicale 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 polyside 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 (polyéthylène glycol), 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 C57Bl/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

anti-inflammatoires comme IL-10 et TGF- β 1. 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

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

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 ^aUniv Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et
7 travail), UMR_S 1085, Rennes, France

8 ^bUniv Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) -
9 UMR_S 1085, Rennes, France

10 ^cInstitute of Parasitology, Department of Infectious Diseases and Pathobiology, Vetsuisse Faculty,
11 University of Bern, Bern, Switzerland

12 ^dInstitut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, UPS,
13 Toulouse, France

14 ^eInstitute 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; sarah.dion@univ-rennes1.fr; +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

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.
31 Wild-type (WT) and IL-33^{-/-} C57Bl/6J mice were infected by peritoneal inoculation with *E.*
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
34 patients with AE. Overall, metacestode lesions were smaller in IL-33^{-/-} than in WT mice. IL-33 was
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
37 were positively correlated with parasite mass in WT, but not in IL-33^{-/-} mice. In human AE, IL-33
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
40 infiltrates together with FOXP3⁺ T_{regs}. In the murine model, periparasitic IL-33 correlated with
41 accelerated parasite growth putatively through polarization of M2-like macrophages and release of
42 immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF-β1. 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.

54

55 INTRODUCTION

56 Alveolar echinococcosis (AE) is a widespread zoonosis caused by the parasite *Echinococcus*
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
74 interacts with the receptor ST2 (also called IL-1RL1), naturally expressed by tissue-resident immune
75 cells such as mast cells, type-2 innate lymphoid cells (ILC2) and T_{reg} lymphocytes (10), as well as
76 circulating immune cells such as Th2 cells and eosinophils (11). However, ST2 expression can be
77 induced in many cell types, including neutrophils and macrophages (10). IL-33 is mostly described to

78 have “tolerogenic” effects, as it can induce Th2 immunity, it can also regulate pro-inflammatory
79 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 T_{reg} 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
88 in wild-type (WT) and IL-33^{-/-} mice. We showed that IL-33 favors metacestode development in mice.
89 Findings are consistent with a local role of IL-33, as ST2⁺ cell populations are recruited at the site of
90 infection (T CD4⁺ cells, macrophages, neutrophils, eosinophils) and IL-33 is detected in periparasitic
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±5.6 g) compared to those
100 that developed in the IL-33^{-/-} mice (m=7.7±3.5 g, p ≤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. ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively) (Figure
103 1B). Expression of the parasitic *Em14-3-3* gene, a metacestode viability marker, was reduced in the
104 IL-33^{-/-} group ($p \leq 0.01$) (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 ≤ 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, $p \leq 0.05$), together with the expression of M2 markers such as the *Cd163*, *Arg1* and *Tlr8*
121 genes (Figure 2C, $p \leq 0.05$), 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 ($p \leq 0.05$), 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 ($p \leq 0.05$), 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 ($p \leq 0.05$) and infected IL-33^{-/-}
134 animals ($p \leq 0.05$, Figure 3). Concentrations of TGF- β 1 ($p \leq 0.01$), TNF- α ($p \leq 0.01$), IL-2 ($p \leq 0.01$),
135 IL-9 ($p \leq 0.05$) and CXCL1 ($p \leq 0.05$) 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 ≤ 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* ($p \leq 0.001$ and $p \leq 0.05$ for WT and IL-33^{-/-} mice,
144 respectively), together with a decrease of NKT cell population ($p \leq 0.01$ 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 ($m=0.45\pm0.45$) compared to uninfected controls
151 ($m=1\pm0.22$, $p\leq0.05$) (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 ($p\leq0.05$).

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-1 β , TNF- α) except IL-13, IL-12p40 and IL-23, significantly increased over time in
158 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 ($p\leq0.05$, 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 ($p\leq0.05$, Supplementary Figure 3). At a later stage, higher IL-17F
162 concentrations were observed in the sera of IL-33^{-/-} mice ($p\leq0.05$ 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 ($r=0.86$, $p\leq0.001$) and IL-5 ($r=0.88$, $p\leq0.001$), but also the Th1 IFN- γ ($r=0.81$, p
170 ≤0.01). In this group, hierarchical classification showed a strong connection between the weight of

171 parasitic lesions, and IL-4, IL-5 and IFN- γ , which belonged to the same cluster. In IL-33^{-/-} mice, also
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
176 TNF- α (p ≤ 0.05) and IFN- γ (p ≤ 0.05). Altogether, these results showed that IL-33^{-/-} mice had a more
177 efficient Th1/Th17 component at late stage than WT mice. The systemic Th2 component was similar
178 in both groups, but was not associated with an accelerated parasite growth in IL-33^{-/-} mice, in contrast
179 to the WT group. This suggests that the mixed Th1/Th2 response observed in WT mice requires IL-
180 33 to favor the metacystode 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 ≤ 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

195 periparasitic tissues) and some hepatocytes (only in close parenchyma), but the density of IL-33⁺
196 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
211 these cytokines in parasite growth (5). However, such correlation was not observed in IL-33^{-/-} mice,
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_{regs}
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
217 to IL-33^{-/-} mice. Additionally, we observed that proportion CD206⁺ macrophages in peritoneal fluid

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-β1, 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-β1 in the peritoneal cavity, compared to WT mice. We also observed a tendency to lower
232 concentrations of the Th1 cytokines TNF-α (together with repression of *Tnfa* 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
241 *in vivo* mouse model of colonic inflammation, Schiering et al. showed that IL-33 acts locally, upon

242 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- β 1 production (8, 38), and it was shown
244 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
246 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
248 recruitment of ST2⁺ T_{regs} is independent of IL-33 signal, leading to similar or even higher proportions
249 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
252 main source of the alarmin are endothelial cells of the neovessels, but a role for the IL-33⁺
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
255 accumulation of periparasitic CD31⁺IL-33⁺ endothelial cells (41, 43). As the parasite grows, it
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).
258 Following its release, IL-33 activates locally recruited ST2⁺ cells, such as T_{reg} and non- T_{reg} CD4⁺
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
282 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
287 samples were collected from 5 AE patients managed at the Rennes University Hospital, with the
288 approval of the local Ethics Committee (approval no 20.133).

289 **Animals and infection procedure**

290 The IL-33^{-/-} strain of C57Bl/6J mice was developed in Université de Toulouse (49). Animals were
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*.
294 IL-33^{-/-} mice were crossed with C57Bl/6J mice (Charles River Labs, Saint-Germain-Nuelles, France).
295 Heterozygous mice were crossed in order to obtain IL-33^{-/-} and WT littermate newborns. Mice were
296 8-10 week-old before peritoneal inoculation with 100 µL of metacystode 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 metacystodes 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
302 peritoneal inoculation. Additionally, non-infected WT and IL-33^{-/-} littermates were grouped together
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.

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
314 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**

318 Murine IL-33 was quantified in sera and periparasitic tissues of mice using the DuoSet® Mouse IL-
319 33 assay (R&D Systems™, 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 Systems™, 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
331 staining. Cell suspensions were labeled for 30 min with LIVE/DEAD™ fixable stain (Invitrogen™,
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
335 panels to avoid unspecific staining. Acquisition was performed with the LSR X-20 Fortessa™ flow
336 cytometer (Becton Dickinson, Plateform CytomeTRI, SFR Biosit–UMS CNRS 3480-INSERM 018,

337 Rennes, France) and data were analyzed with the Flowlogic™ 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
340 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®, Hoerd, 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
348 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
356 from 60°C to 95°C. Results were expressed as fold-change expression of IL-33^{-/-} mice compared to
357 WT mice, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Mouse housekeeping genes were *actb* and *gapdh* for liver
358 samples, *gapdh* and *ppid* for periparasitic tissues, and parasite housekeeping gene was *actII*.

359 **Multiplex cytokine dosage**

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
366 cytokines. Acquisition was done with the LSR X-20 Fortessa™ flow cytometer (Becton Dickinson,
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 Nussy-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

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
387 was performed using secondary antibody (anti-rabbit-HRP) incubated for 16 min and the Opal™
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 Panoramic 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
393 QuPath v0.3.2 (58). IL-33⁺ nuclei and FoxP3⁺ cells were counted using an automated cell detection
394 tool, and proportion of CD31⁺ area was quantified using pixel classifier.

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
398 code throughout the manuscript: ns not significant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Difference
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.L.-S.

424 Conceptualization, resources, writing – review & editing. J.-P.Gi. Resources, writing – review &
425 editing. B.G. Conceptualization, writing – review & editing. J.-P.Ga. Resources, funding acquisition.

426 M.S. Resources, funding acquisition, project administration. F.R.-G. & 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

431 **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, Laathamna 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, Manton 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, Manton G, Bresson-Hadni S. 2006.
452 Survival strategy of *Echinococcus multilocularis* 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 $\gamma\delta$
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, Pheesse T, Brunberg J, Poh AR, Etemadi N, Tsantikos E,
507 Thiem S, Huntington ND, Hibbs ML, Boussioutas A, Grimbaldston 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 Hambarzumyan D, Reilly KM, Blough MD, Cairncross 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. PPAR γ drives IL-33-dependent ILC2 pro-tumoral functions. *Nat Commun*
525 12:2538.
- 526 29. Enninga EAL, Chatzopoulos K, Butterfield JT, 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.
- 529 30. Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. 2019.
530 Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*
531 8:1596004.
- 532 31. 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-
533 M, Lin R-Y, Wen H. 2020. Dual role of hepatic macrophages in the establishment of the
534 *Echinococcus multilocularis* metacestode in mice. *Front Immunol* 11:600635.
- 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, Lu X, Manton G, Vuitton DA, Wen H, Lin
539 R. 2013. TGF- β and TGF- β /Smad signaling in the Interactions between *Echinococcus*
540 *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, Adelman 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
554 intestinal cancer. 4. Mucosal Immunol 12:990–1003.
- 555 38. Mejri N, Müller N, Hemphill A, Gottstein B. 2011. Intraperitoneal *Echinococcus multilocularis*
556 infection in mice modulates peritoneal CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cell development.
557 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, Stempel 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 49. Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, Girard J-P. 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 Il-33-LacZ gene trap
592 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, Raguènes-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 Vandenaabeele 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ***
636 $p \leq 0.001$.

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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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 ± 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
650 and 2F), the Mann-Whitney *U* test (Figure 2B and 2C) and the F test (Figure 2D). * p≤0.05, **
651 p≤0.01, *** p≤0.001.

652 **Figure 3. Endogenous IL-33 modulates concentrations of cytokines in peritoneal lavages during**
653 **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 ± SD. Significance was tested using the Kruskal-Wallis test with Dunn's
657 multiple comparison *post-hoc* analysis. * p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001.

658 **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
660 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^{-ΔΔCt} method and the *Gapdh* and *Actb* endogenous
663 controls. Figure 4A, 4B, 4D: Pooled data from 2 independent experiments, with 5 uninfected, 11 WT
664 and 14 IL-33^{-/-} mice. Fig 4C: Data obtained from one experiment, with 5 mice in each group. Plots
665 show mean ± SD. Significance was tested using the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple
666 comparison *post-hoc* analysis. * p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001.

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

668 (A) Cytokines concentrations determined by flow cytometry in the serum of WT and IL-33^{-/-} mice
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
676 experiments, with 10 WT and 14 IL-33^{-/-} mice. The parameter "Lesion" stands for the weight of the
677 metacestodes 4 months post infection. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

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 (* $p \leq 0.05$). (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
687 from 5 patients. (E) Quantification of density of IL-33⁺ nuclei (up), density of FoxP3⁺ cells (middle)
688 and proportion of CD31⁺ area (down), in liver parenchyma and periparasitic granuloma, from
689 immunofluorescence staining of human biopsy slides (n=5). Mann-Whitney *U* test (** $p \leq 0.01$).

690 **Figure 7. Model of the modulation of the host immune response by IL-33 and its impact on**
691 **parasite growth.**

692 (A) A schematic presentation of the IL-33 putative mechanism of action during alveolar
693 echinococcosis (AE). ① IL-33 is released from neovasculature upon tissue damage by parasite
694 growth, ② it locally activates ST2⁺ leukocytes, such as Th2_{RM}, ILC2s and T_{regs}, and contributes to
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.

703

Figure 1.

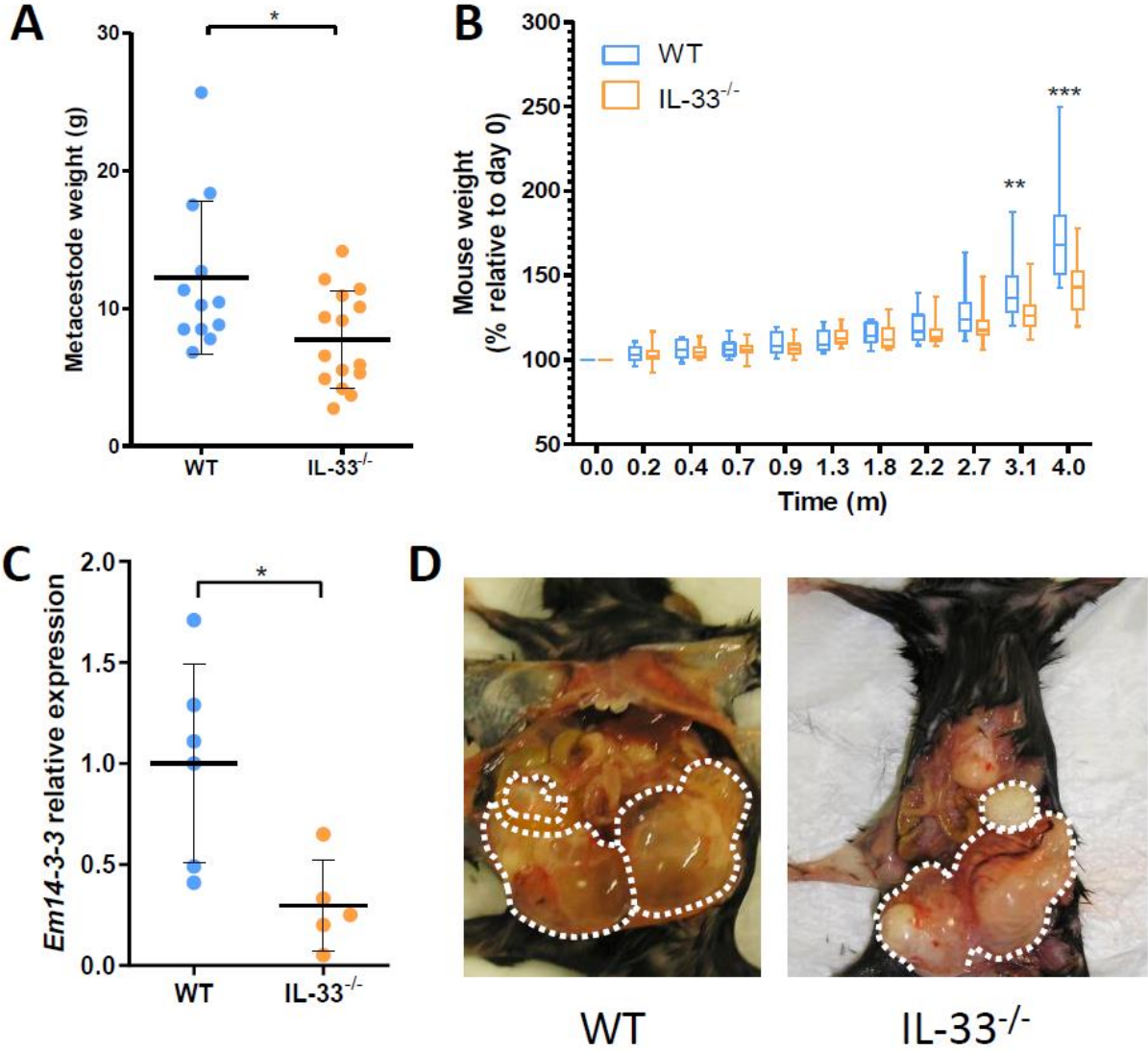


Figure 2.

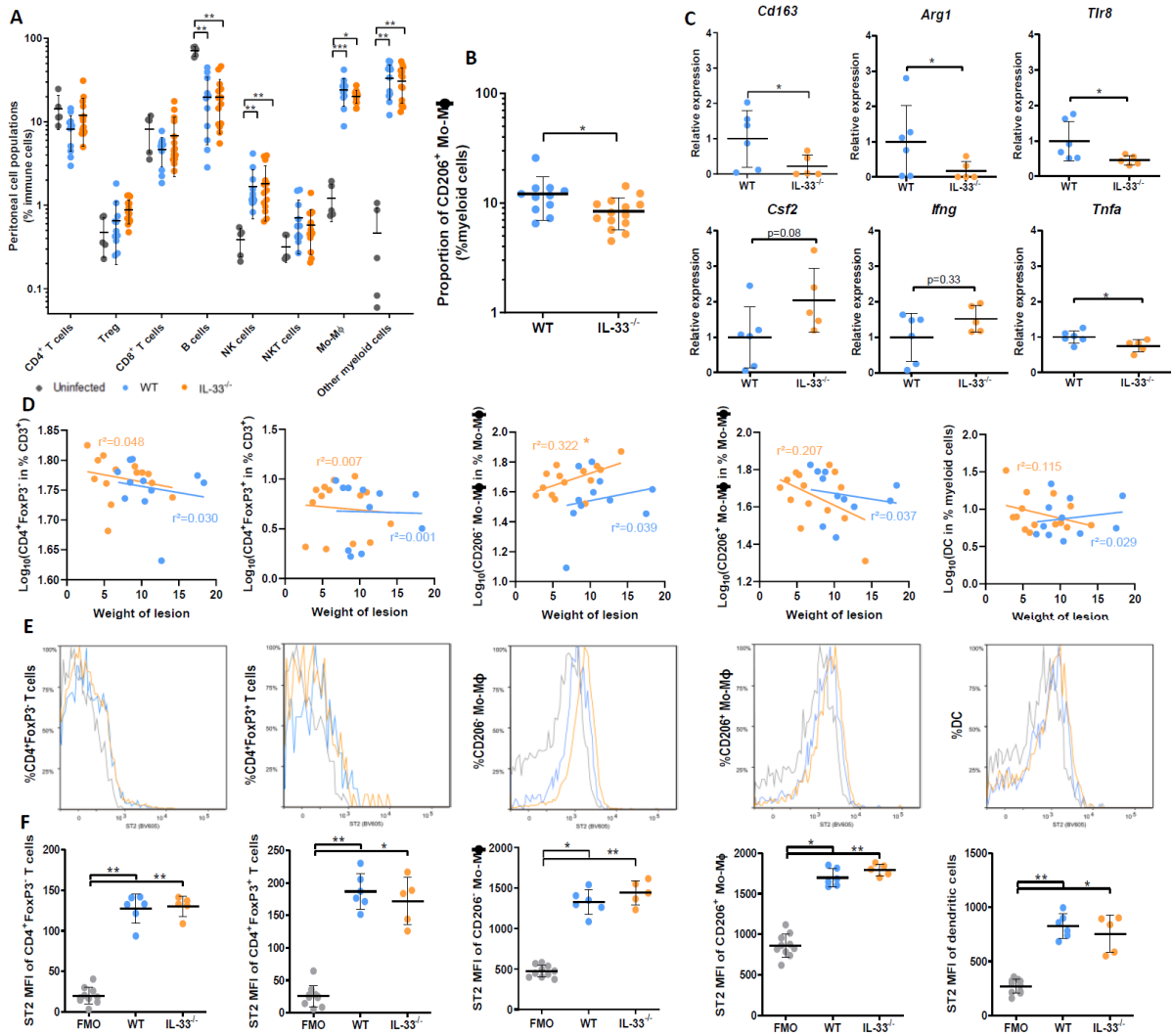


Figure 3.

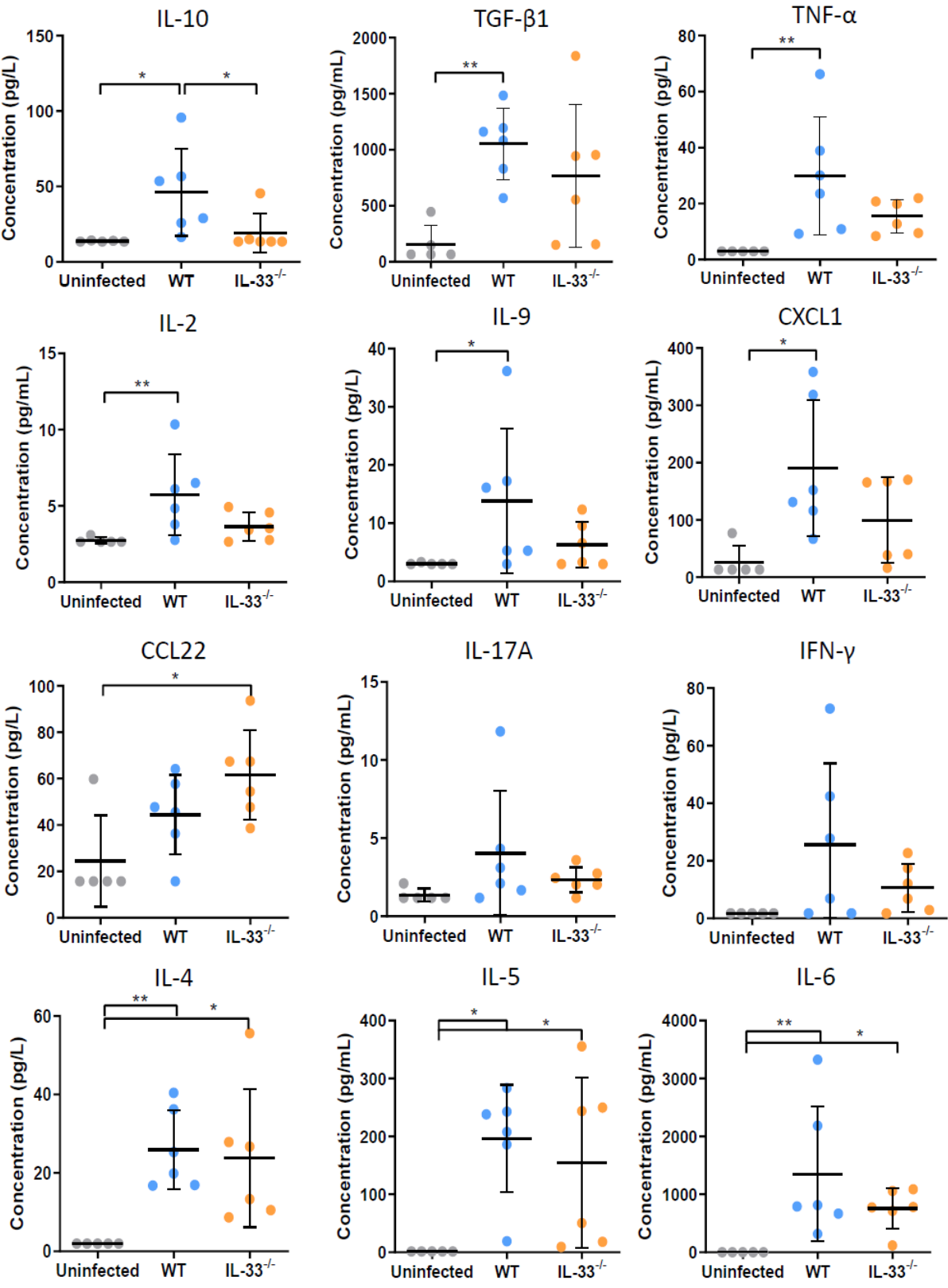


Figure 4.

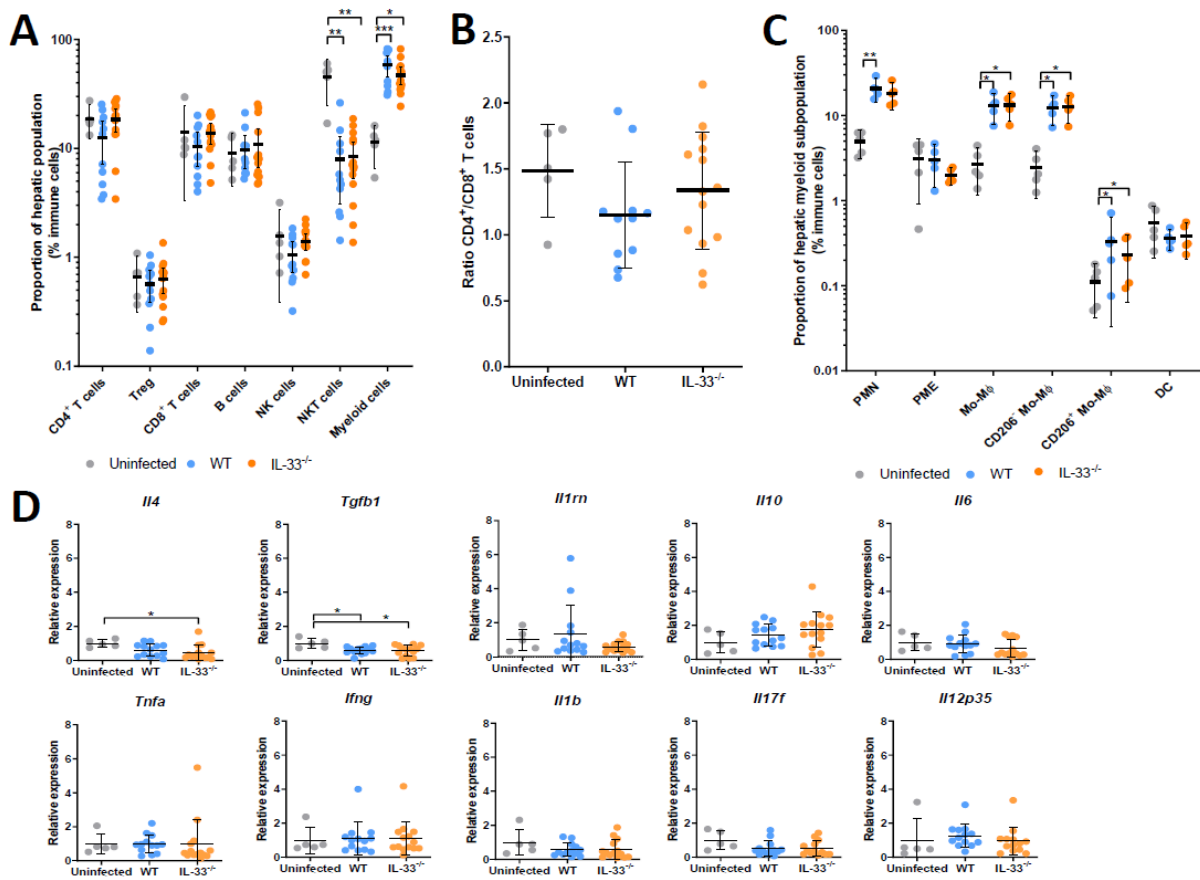


Figure 5.

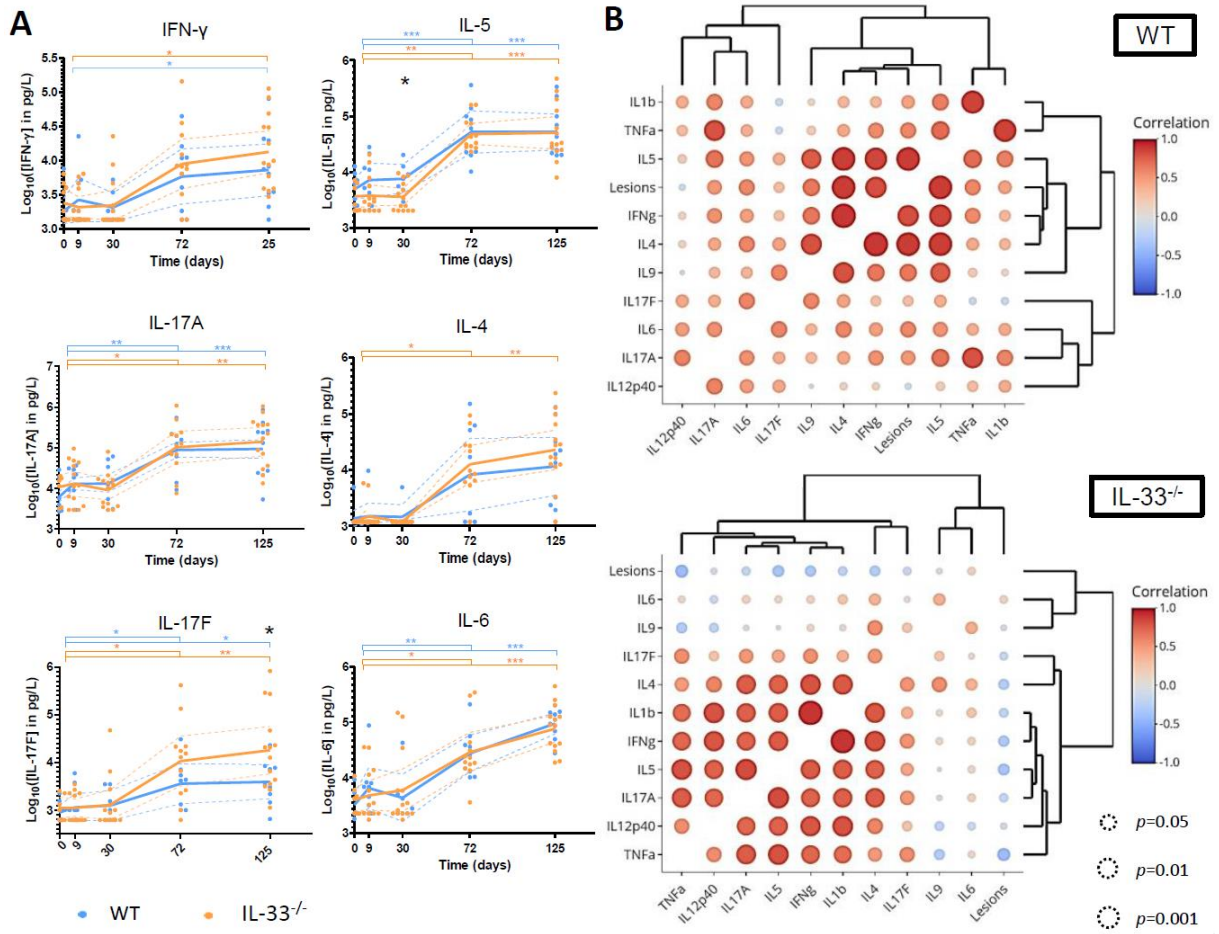


Figure 6.

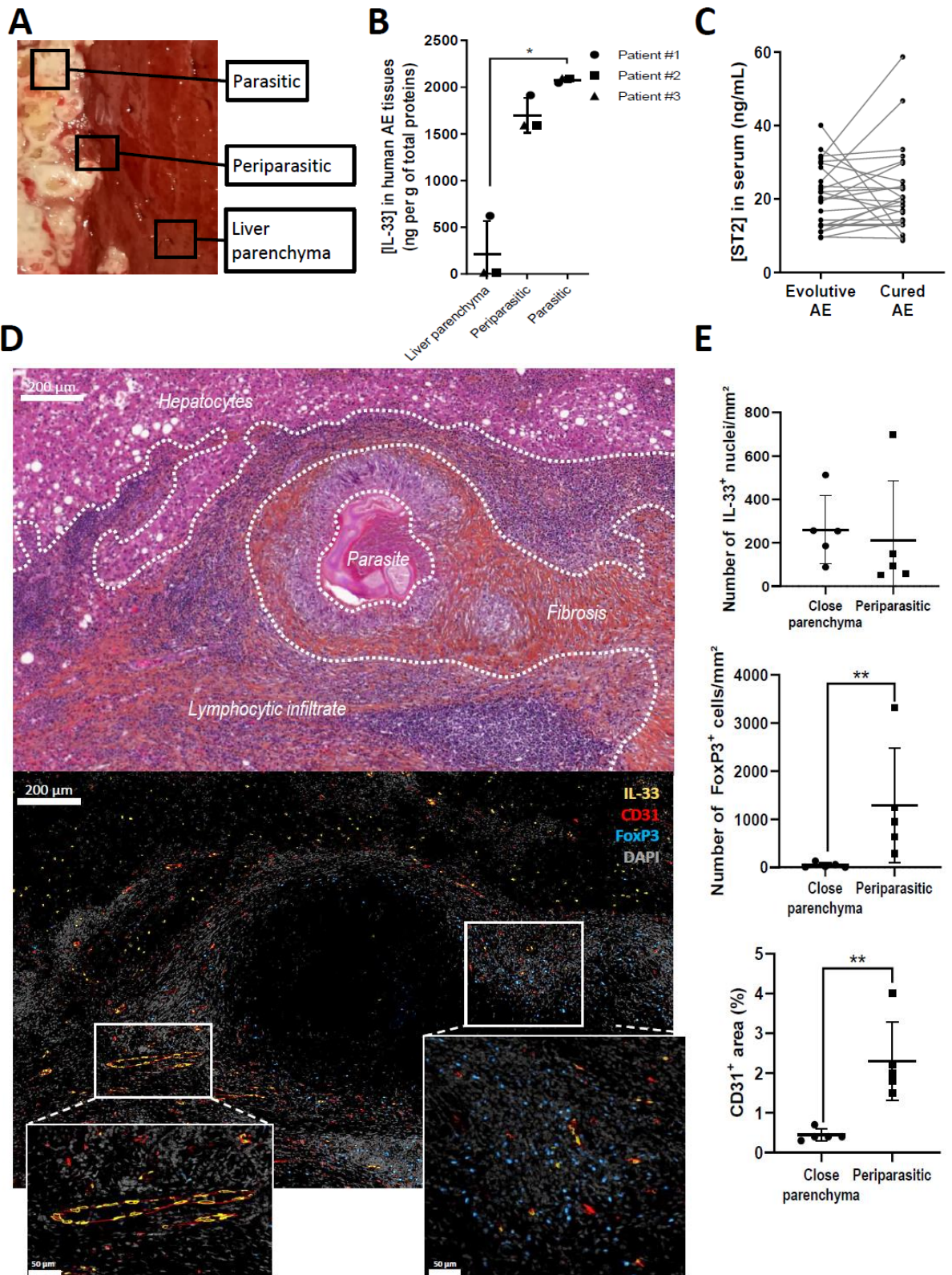
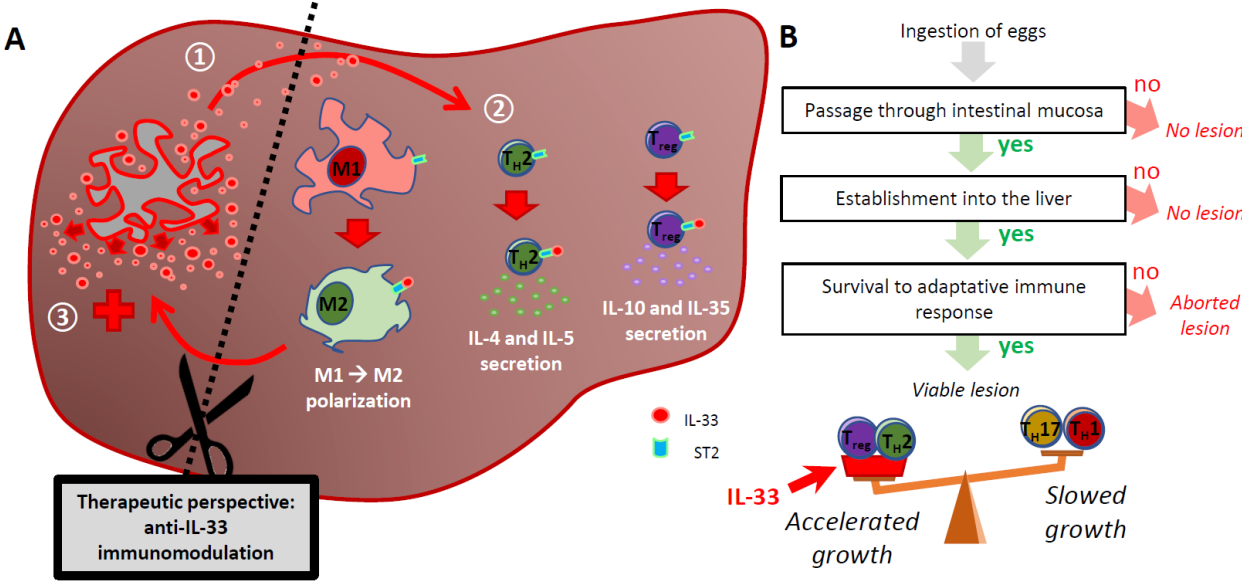
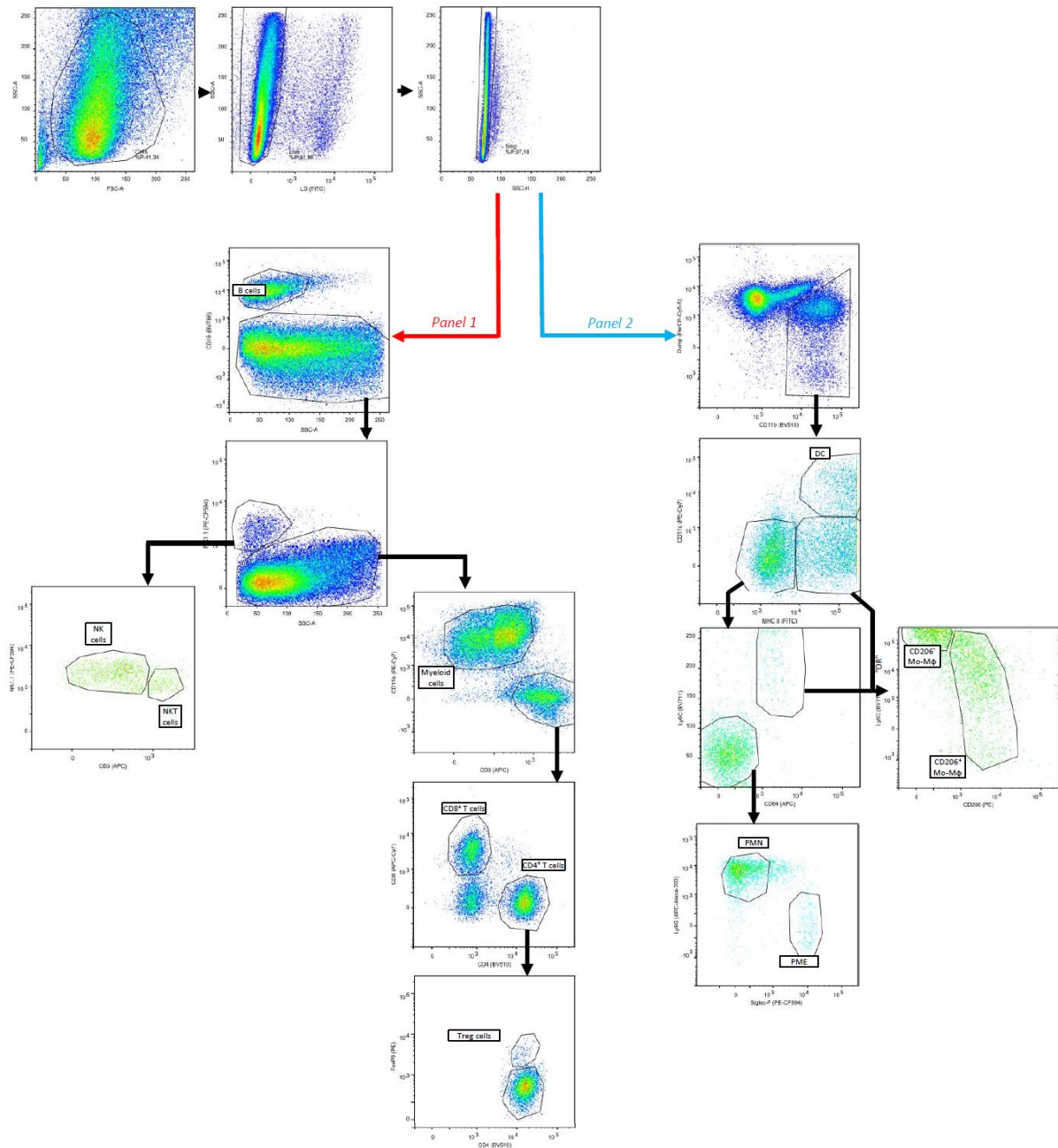
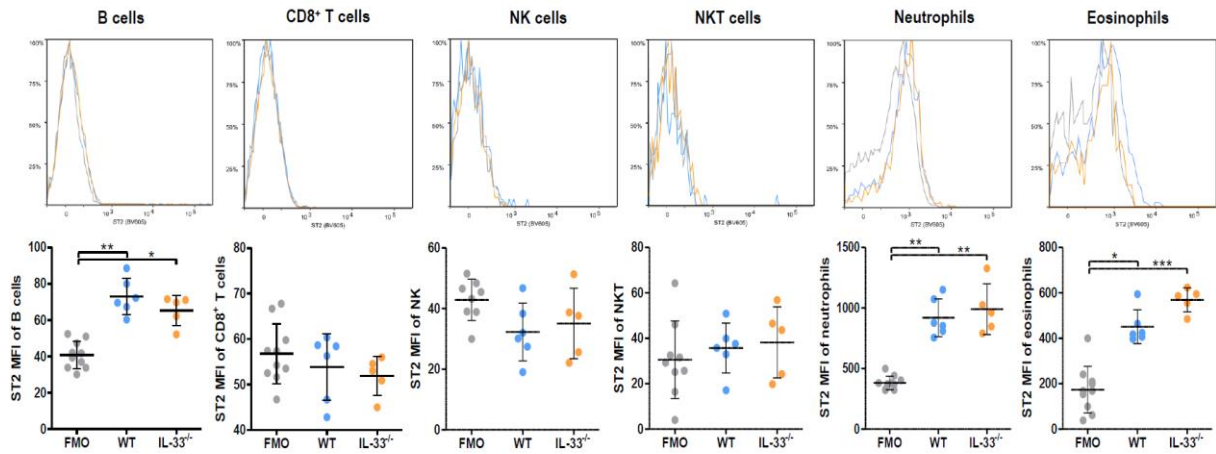


Figure 7.

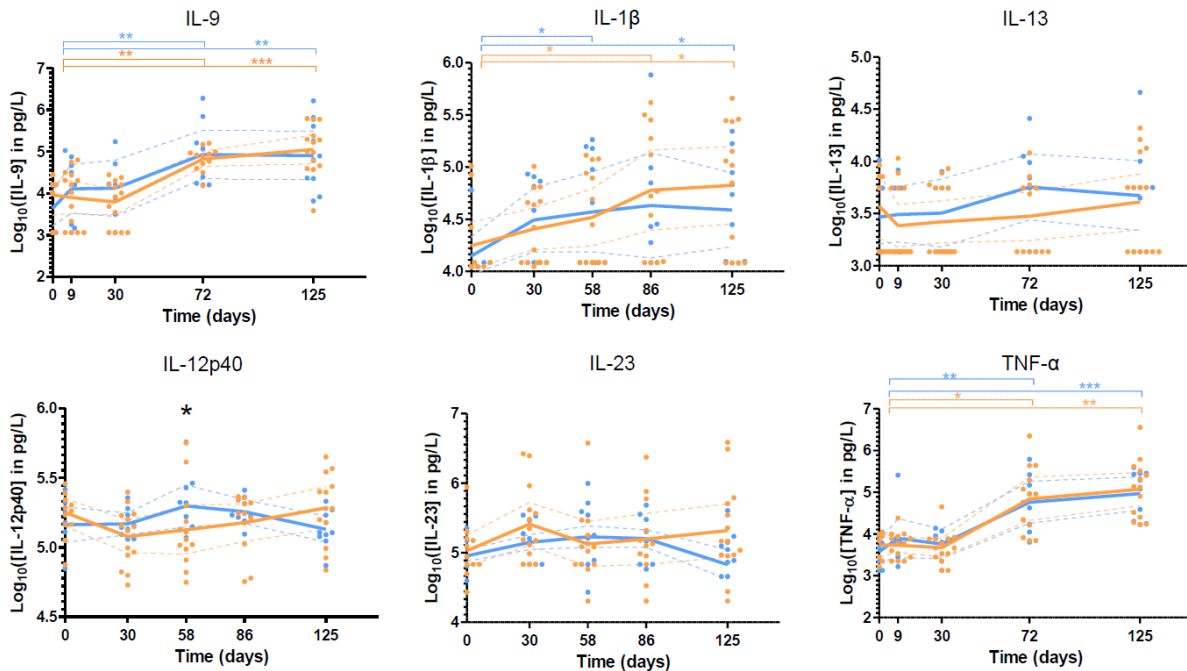




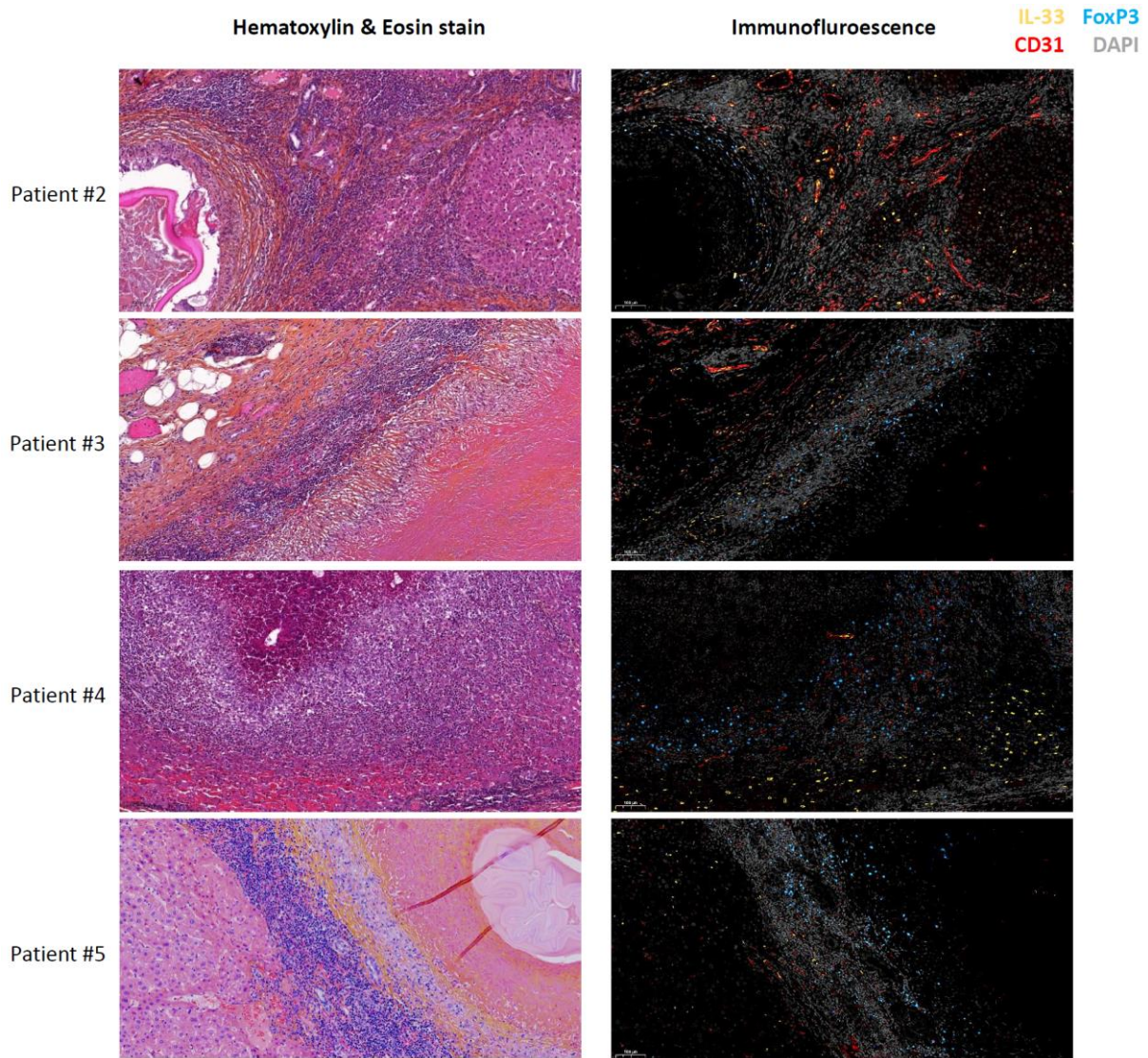
Supplementary Figure 1. Gating strategy. After an initial data cleaning (removing debris, dead cells and doublets), two different strategies were applied, depending on the antibodies panel. For Panel 1, B cells ($CD19^+$) were first isolated, then NK and NKT cells (SSC^{L0} and $NK1.1^+$), which were 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 $MHC-II^{Hi}CD11c^+$ 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<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.



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 ± SD. Significance was tested using the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison *post-hoc* analysis. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<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 montrées 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).

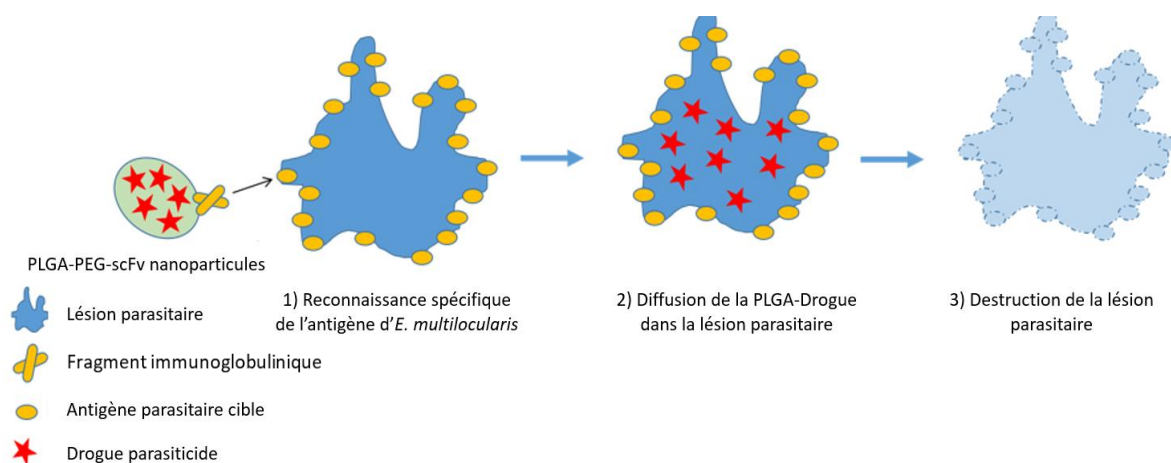


Figure 15. Schéma du projet de recherche NANOTHERA-ECHINO.

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 récives. 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#}

5 ^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

9 ^c Institute of Parasitology, Department of Infectious Diseases and Pathobiology, Vetsuisse
10 Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland

11 ^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, sarah.dion@univ-rennes1.fr, +33(0)223234517

15 **Keywords:**

16 poly(lactic co-glycolic acid), drug delivery system, alveolar echinococcosis, EmPGI

17

18 **Abstract**

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

36 **Introduction**

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

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

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

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

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

79 **MATERIALS AND METHODS**

80 ***Chemicals***

81 Acid terminated PLGA 50:50 MW 24,000–38,000 (Resomer® RG503H), anhydrous
82 dichloromethane, dicyclohexylcarbodiimide (DCC), N-hydroxysuccinimide (NHS), diethyl
83 ether, poly(ethylene glycol) (PEG) bis(amine), dimethylaminopyridine, succinic anhydride,
84 triethylamine, hydrochloric acid, magnesium sulphate, polysorbate, coumarine-6 and
85 dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier,

86 France). Mefloquine hydrochloride was purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX,
87 USA). Analytical reagent grade methanol, acetone and acetonitrile were obtained from VWR
88 international S.A.S. (Fontenay-sous-Bois, France).

89 *Synthesis and characterization of PLGA-PEG-COOH polymer*

90 *Activation of COOH group on PLGA*

91 Dissolved PLGA in anhydrous dichloromethane was reacted with DCC and NHS for 24 h at
92 room temperature (RT) under nitrogen atmosphere at a stoichiometric molar ratio of
93 PLGA:DCC:NHS of 1:10:10. The by-product N,N'-dicyclohexylurea was removed by filtering
94 through a 0.45- μ m Teflon® syringe filter. The filtrate was precipitated and washed with ice-
95 cold 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*

101 PLGA-PEG-NH₂ (300 mg), dimethylaminopyridine (65.3 mg) and succinic anhydride (43.1
102 mg) were mixed and dried under vacuum for 1 h. Afterwards, triethylamine (42.9 mg) was
103 added and the mixture was dissolved in anhydrous dichloromethane. The reaction was stirred
104 overnight under argon. The crude was then successively washed 3 times with hydrochloric acid
105 at pH=3, 3 times with water and finally 3 times with brine. The organic layer was dried over
106 magnesium sulphate, the solvent evaporated and PLGA-PEG-COOH was isolated with a 99.7%
107 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,

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

120 *Nanoparticles formulation and characterization*

121 *Nanoparticles formulation*

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

135 *Nanoparticles characterization*

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

149 *Parasite material*

150 *Ethics statement*

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

156 *Animals and infection procedure*

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

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

167 *Primary metacestode culture*

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

176 *Assessment of PLGA entry*

177 In order to assess if nanoparticles pass through the laminated layer of the parasite, we exposed
178 *E. multilocularis* metacestodes to coumarine-6-loaded PLGA nanoparticles and we detected
179 fluorescence in the germinal layer cells and vesical fluid. In a 2 mL tube, 500 µL of *in vitro*
180 cultured *E. multilocularis* vesicles was exposed to 500 µL of a 1:1 dilution in PBS of either
181 coumarine-6-loaded or unloaded PLGA-PEG-COOH nanoparticles for 30 min, 90 min or 24 h.
182 The supernatant was sampled, the vesicles were washed 3 times with PBS and the third washing
183 supernatant was sampled. The remaining PBS was removed by careful pipetting, the vesicles
184 were broken, the whole suspension was centrifuged at 500 g for 5 min (RT) and the whole
185 supernatant (vesical fluids) was sampled. The pellet, which contained laminated and germinal

186 layers, was suspended in 200 μ L of trypsin-EDTA 0.25% (Gibco™, Thermo Fisher Scientific,
187 Illkirch, France) and incubated 5 min at RT under manual shaking. The suspension was then
188 filtered through 70 μ m cell strainers (Corning™, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier,
189 France), the filtrate was centrifuged at 500 g for 5 min (RT), washed with PBS, and after another
190 centrifugation at 500 g for 5 min, the pellet was lysed by 90 μ L of a 1% solution of Triton X-
191 100™ in PBS (cell extract). Finally, optical density of 90 μ L of each sample (nanoparticles
192 solution, third wash, vesical fluid, cell extract) was measured at 520 nm under excitation at 450
193 nm in a black 96-well plate.

194 *In vitro* cultured *E. multilocularis* vesicles were distributed in 12 wells culture plate and
195 exposed to a 1:1 dilution in PBS of either coumarine-6-loaded or unloaded PLGA-PEG-COOH
196 nanoparticles for 5 min, 15 min and 30 min, before to be washed in PBS, fixed in formalin 4%
197 and re-suspended in PBS. Exposed vesicles were immediately processed in ibidi™ μ -Slide
198 Angiogenesis with glass bottom (ibidi™, Munich, Germany) and analyzed by microscopical
199 examination using the Leica™ TCS SP8 confocal microscope (Leica™, Mannheim, Germany).
200 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*

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

210 were crushed and 120 μ L of supernatant was sampled again. All the supernatants were stored
211 frozen at -20°C until further analysis.

212 *Enzymatic assay*

213 Activity of mefloquine-loaded PLGA-PEG-COOH nanoparticles was evaluated *in vitro* by
214 indirect detection of the released EmPGI from the metacestodes, as previously described (27).
215 The assay is based on an enzymatic reaction initiated by extemporaneous addition of fructose-
216 6-phosphate to a reactional mix containing EmPGI (putatively in supernatant), $4,4 \cdot 10^{-1}$ mM β -
217 nicotinamide adenine dinucleotide hydrate, 1,8 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase,
218 $8,8 \cdot 10^{-1}$ mM EDTA and 100 mM Tris-HCl (all reagents from Sigma Aldrich, Saint-Quentin-
219 Fallavier, France). In presence of EmPGI, NADH, H^+ was generated and detected by continuous
220 detection of absorbance at 340 nm during 30 min using the SPECTROstarTM Nano
221 spectrophotometer (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France). For each condition,
222 enzyme blank (no substrate) was performed in duplicate, and reaction was performed in
223 triplicate. For each time point, the mean of the enzyme blank was subtracted from the mean of
224 the reaction. A nonlinear regression curve was then fitted for each condition using GraphPad
225 Prism software v8.0.2 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Drug activity (proportion of released
226 EmPGI expressed as % Triton X-100) was calculated from the initial slope (which was
227 proportional to the quantity of EmPGI) for supernatant (released EmPGI) and for crushed
228 vesicles suspension (total EmPGI) using Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft France, Issy-
229 les-Moulineaux, France).

230 *Statistical analysis*

231 Statistical analysis and plots of data were done using GraphPad Prism software v8.0.2
232 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). The α risk was set to 0.05 for all analyses, and the same
233 representation of significance was used throughout the manuscript: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and
234 *** $p < 0.001$. Stability of each physical characteristic of the mefloquine-loaded PLGA

235 nanoparticles was analyzed using the non-parametric Friedman test for paired data, with *post-*
236 *hoc* Dunn's multiple comparisons test. Fluorescence intensities and antiparasitic activities were
237 compared using the two-way ANOVA test. *Post-hoc* analysis compared all compounds to each
238 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
243 of -COOH terminal group, the spectra exhibited a broad O-H stretching at 3200–3650 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 (T_g) during chemical transformation
248 (Figure 2). For native PLGA, T_g 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, T_g increase again
250 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*

253 At synthesis, the size of the mefloquine-loaded nanoparticles was 128.7 ± 5.5 nm with low
254 polydispersity index (PDI) of 0.11 ± 0.00 (monodisperse system if PDI < 0.2 (28)) and a
255 satisfying (< 30 mV) zeta potential of -21.2 ± 5.8 mV (Table 1). Size and PDI were stable
256 during at least 7 days. Zeta potential was significantly different between the synthesis and 1
257 day later, as showed by the *post-hoc* Dunn's test (p<0.05), and was then stable. This
258 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***

263 After exposition of *E. multilocularis* metacestodes to coumarine-6-loaded nanoparticles during
264 30 min, fluorescence was detected by spectrofluorimetry in germinal layer cells extract, and, to
265 a lesser extent, in vesical fluid (Figure 3). After 90 min of exposition, fluorescence was detected
266 equally in both vesical fluid germinal layer cells extract. Finally, after 24 h of exposition,
267 fluorescence intensity was high in cells extract and vesical fluid, equally with the solution of
268 nanoparticles. Fluorescence was not detected in vesicles not exposed to coumarine-6-loaded
269 nanoparticles (data not shown).

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

274 ***In vitro activity against E. multilocularis metacestodes***

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

285 **DISCUSSION**

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

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

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

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

319 Few studies evaluated drug delivery systems for treatment of AE. The first one evaluated
320 doxorubicin-loaded polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles (38), then were evaluated
321 multiple formulations of albendazole (31–33, 39), and recently a study successfully treated AE
322 infected mice with magnetic nanoparticles (PLGA-Fe) loaded with E2-a, an alkaloid compound
323 extracted from the traditional Tibetan medicine *Sophora moorcroftiana* (40). If most of these
324 studies highlighted improvement or at least equal activity of these formulations compared to
325 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
328 parasite. Mefloquine was easily encapsulated in PLGA nanoparticles, with an encapsulation
329 rate of 80% allowing optimal production of mefloquine-loaded nanoparticles. Formulations are
330 stable in time, which makes the therapeutic use possible. We also showed that *in vitro* activity
331 was similar between free and encapsulated mefloquine. This means that mefloquine-loaded
332 PLGA nanoparticles are good candidates for AE treatment, as it could deliver this highly active
333 compound directly to the parasite.

334 **ACKNOWLEDGMENTS**

335 Authors have no conflict of interest to declare.

336 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
339 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.

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358 **REFERENCES**

- 359 1. Casulli A. 2020. Recognising the substantial burden of neglected pandemic cystic and alveolar
360 echinococcosis. *Lancet Global Health* 8:e470–e471.
- 361 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,
364 Jalousian F, Jemli MH, Knapp J, Laatanma 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, Junghans T, Manton GA. 2020.
370 International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. *Parasite* 27:41.
- 371 3. Vuitton DA, Zhang SL, Yang Y, Godot V, Beurton I, Manton G, Bresson-Hadni S. 2006.
372 Survival strategy of *Echinococcus multilocularis* in the human host. *Parasitol International*
373 55:S51–S55.
- 374 4. Brunetti E, Kern P, Vuitton DA. 2010. Expert consensus for the diagnosis and treatment of
375 cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica* 114:1–16.
- 376 5. Schantz PM, Van den Bossche H, Eckert J. 1982. Chemotherapy for larval echinococcosis in
377 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
379 importance of being parasiticidal... an update on drug development for the treatment of alveolar
380 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
388 buparvaquone against *Echinococcus multilocularis*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 8:440–450.
- 389 10. Spicher M, Roethlisberger C, Lany C, Stadelmann B, Keiser J, Ortega-Mora LM, Gottstein B,
390 Hemphill A. 2008. In vitro and in vivo treatments of *Echinococcus* protoscoleces and
391 metacestodes with artemisinin and artemisinin derivatives. Antimicrob Agents Chemother
392 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
395 alveolar echinococcosis. PLoS Negl Trop Dis 10:e0004535.
- 396 12. Joekel DE, Lundström-Stadelmann B, Müllhaupt B, Hemphill A, Deplazes P. 2018. Evaluation
397 of kinase-inhibitors nilotinib and everolimus against alveolar echinococcosis in vitro and in a
398 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 Vectors*
407 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
414 *Echinococcus multilocularis*-infected mice with the antimalarial drug mefloquine that potentially
415 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.
- 419 20. Lundström-Stadelmann B, Rufener R, Hemphill A. 2020. Drug repurposing applied: Activity of
420 the anti-malarial mefloquine against *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol Drugs Drug*
421 *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.
440 *Echinococcus multilocularis* phosphoglucose isomerase (EmPGI): a glycolytic enzyme involved
441 in metacestode growth and parasite-host cell interactions. *Int J Parasitol* 40:1563-1574.
- 442 27. Stadelmann B, Scholl S, Müller J, Hemphill A. 2010. Application of an in vitro drug screening
443 assay based on the release of phosphoglucose isomerase to determine the structure-activity
444 relationship of thiazolides against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *J Antimicrob*
445 *Chemother* 65:512-519.
- 446 28. Caputo F, Clogston J, Calzolari L, Rösslein M, Prina-Mello A. 2019. Measuring particle size
447 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.
- 450 29. Yang N, Ma W, Ke Y, Liu H, Chu J, Sun L, Lü G, Bi X, Lin R. 2022. Transplantation of
451 adipose-derived stem cells ameliorates *Echinococcus multilocularis*-induced liver fibrosis in
452 mice. *PLoS Negl Trop Dis* 16:e0010175.

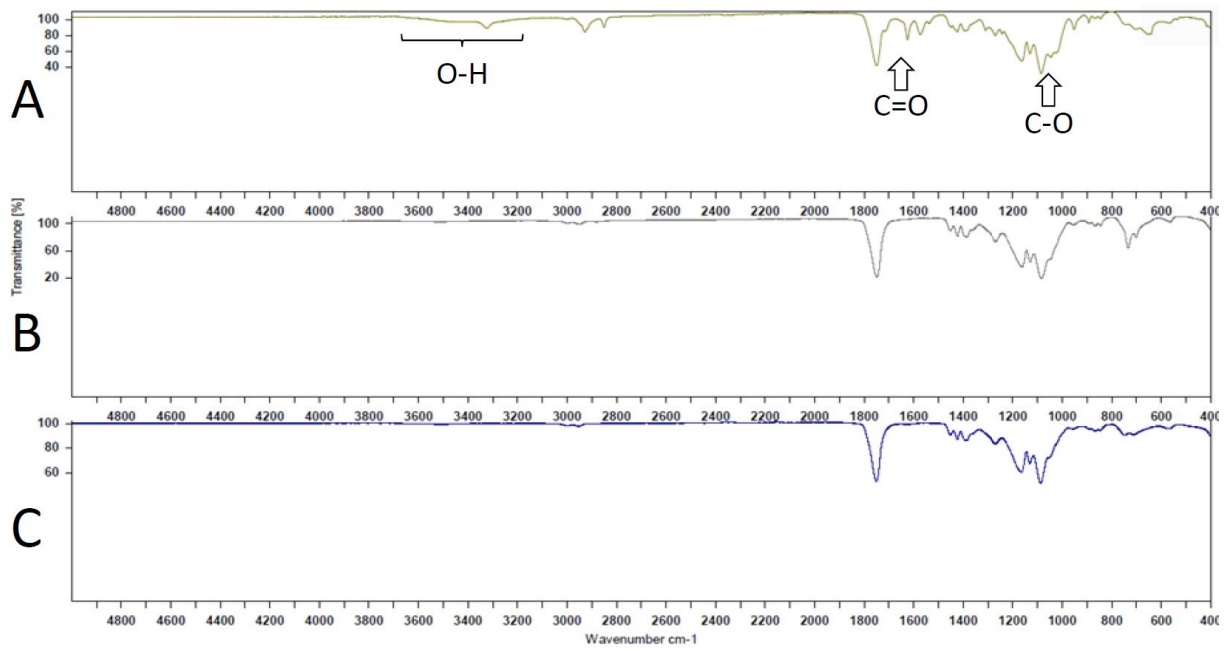
- 453 30. Chauchet A, Grenouillet F, Knapp J, Richou C, Delabrousse E, Dentan C, Millon L, Di Martino
454 V, Contreras R, Deconinck E, Blagosklonov O, Vuitton DA, Bresson-Hadni S, FrancEchino
455 Network. 2014. Increased incidence and characteristics of alveolar echinococcosis in patients
456 with immunosuppression-associated 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 *Echinococcus multilocularis*. *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.
- 479 39. Rodrigues JM, Bories C, Emery I, Fessi H, Devissaguet JP, Liance M. 1995. Development of an
480 injectable formulation of albendazole and in vivo evaluation of its efficacy against *Echinococcus*
481 *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.
- 485
- 486

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 significance
	0	1	2	3	4	7	
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 (mV)	-21.2 ± 5.8	-13.7 ± 5.3	-15.4 ± 4.9	-16.3 ± 5.5	-16.4 ± 5.9	-19.5 ± 6.0	**

491



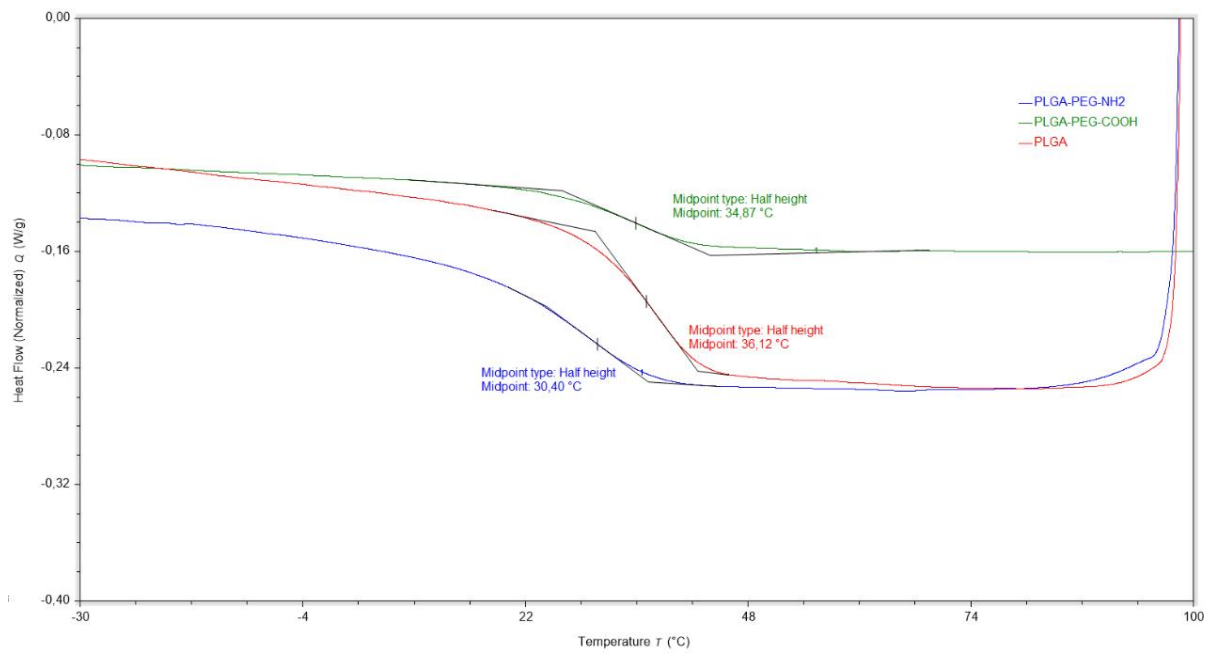
492

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

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

495 (A).

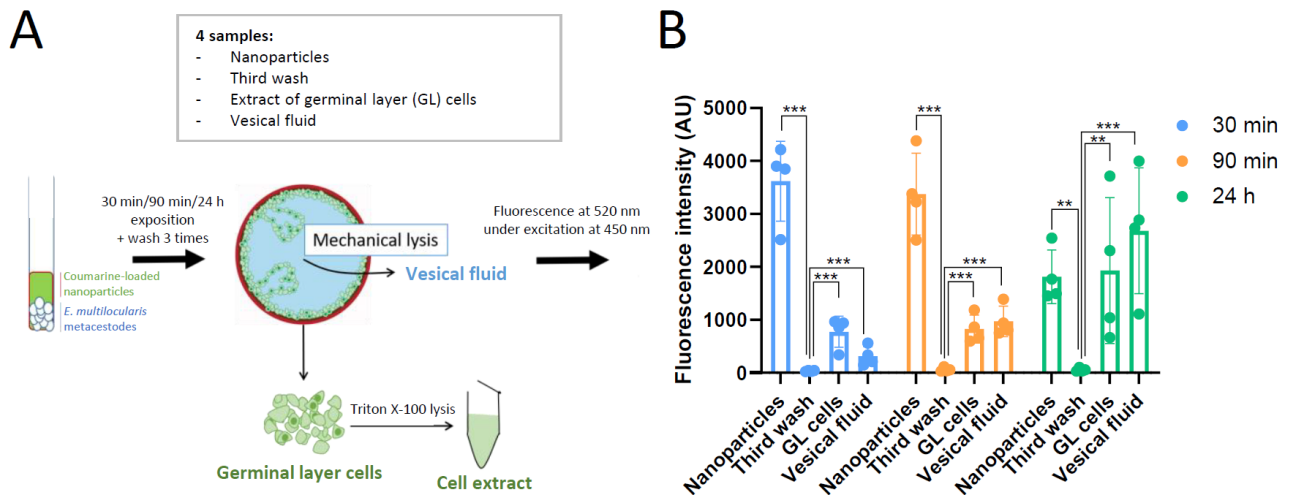
496



497

498 **Figure 2.** Differential scanning calorimetry thermograms of PLGA polymers.

499



500

501 **Figure 3.** Fluorimetry of supernatants and metacystode fractions after exposition to coumarine-

502 6-loaded PLGA nanoparticles. (A) *E. multilocularis* metacystodes were exposed to coumarine-

503 6-loaded nanoparticles during 30 min, 90 min or 24 h, washed, and vesical fluid and germinal

504 layer cells were obtained by mechanical disruption of the vesicles. Four samples were collected:

505 the solution of nanoparticles, the third wash solution, the extract of germinal layer cells and the

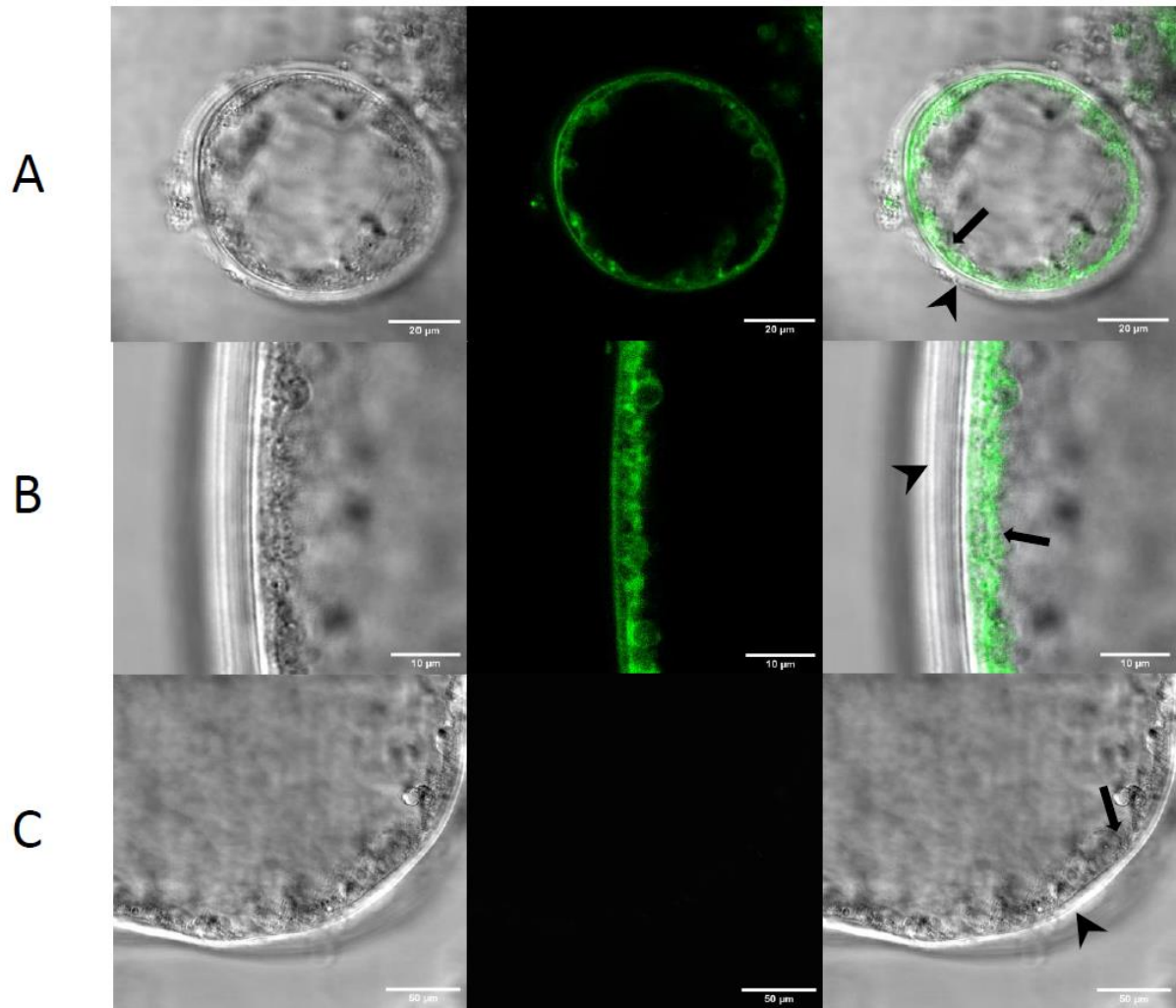
506 vesical fluid. (B) Plot showing fluorescence intensity at 520 nm under 450 nm excitation of the

507 previously collected samples. For each condition, plot shows pooled data from 4 independent

508 experiments, mean and SD. Data were compared using two-way ANOVA and *post-hoc* Tukey's

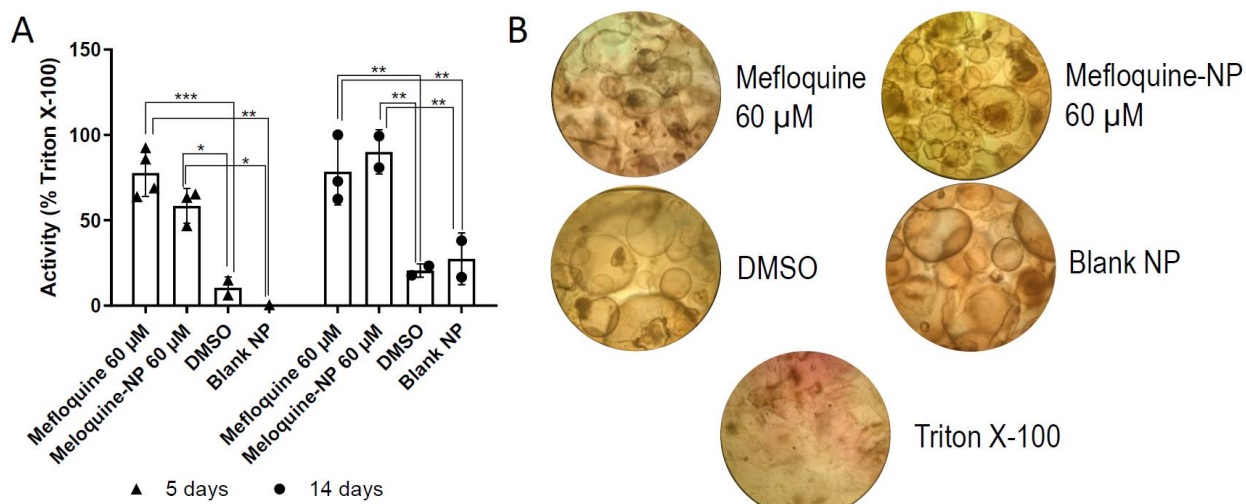
509 multiple comparison test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

510



511

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



518

519 **Figure 5. Activity of compounds against *Echinococcus multilocularis* metacestode.** (A) Plot

520 showing *in vitro* release of EmPGLI expressed in percentage of the positive control (Triton X-

521 100). Data obtained from one experiment. Data were compared using two-way ANOVA and

522 *post-hoc* Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) Pictures of

523 the vesicles after 12 days of *in vitro* exposition to the indicated treatment. Vesicles were broken

524 when exposed to 60 μ M mefloquine, 60 μ M mefloquine-loaded PLGA nanoparticles

525 (mefloquine-NP) and Triton X-100. Morphology of vesicles was not altered when exposed to

526 DMSO or unloaded PLGA nanoparticles (blank NP). Pictures are representative of one

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 *Il1rl1^{fl/fl}FoxP3^{YFP^{Cre}}* et un groupe contrôle de souris *Il1rl1^{+/+}FoxP3^{YFP^{Cre}}* [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 conditionnelle, 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).

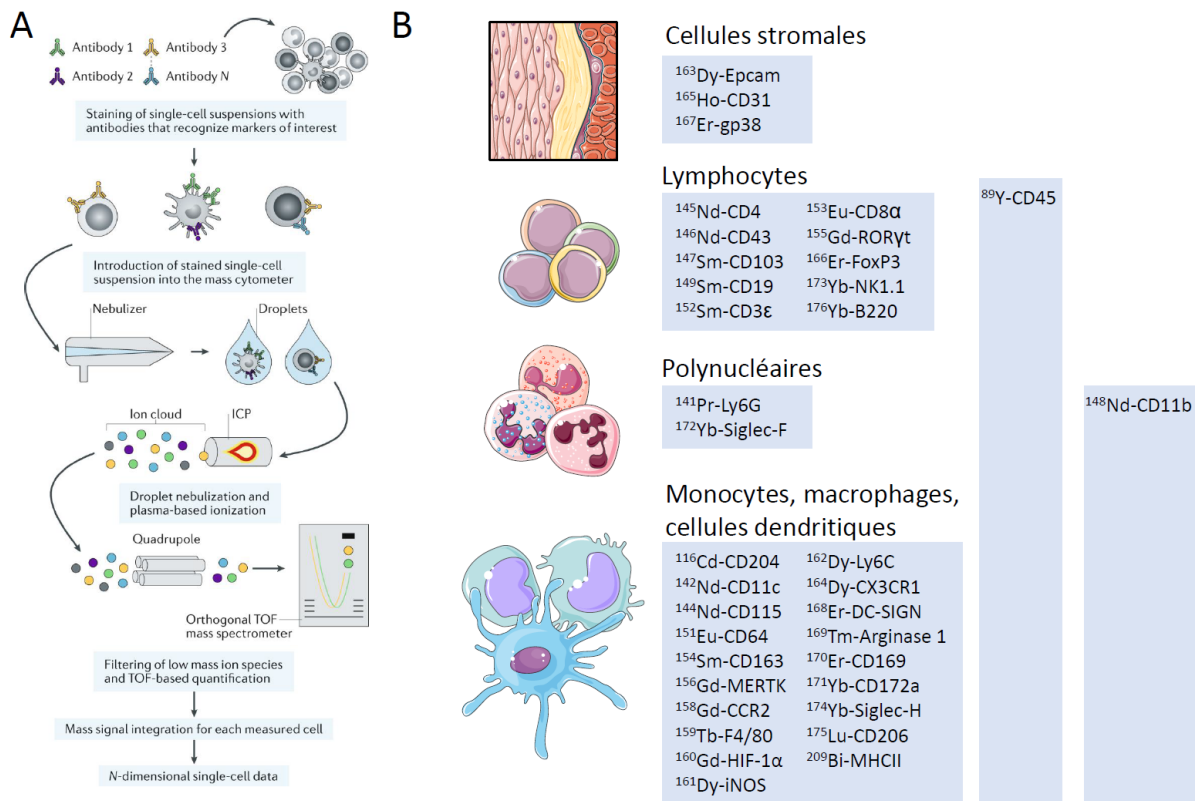


Figure 16. Schéma explicatif de la technologie de cytométrie de masse.

(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 LTβR, 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 débiter 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 Em11/3-10 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 pourrions 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] Świdorski 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, Bardonnnet 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’échinococcosse 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.has-sante.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, Manton 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 metacystode 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](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 $\alpha\beta+$ CD4+ T-cell-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 RccHanTM: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 immunosuppression-associated 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 alpha β + 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, Manton 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](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, Stempel 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-1 α 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, Sobacki M, Isagawa T, Gotthardt D, et al. Loss of HIF-1 α 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-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003;112:645–57. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00154-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00154-5).
- [89] Shevryev 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, DeCoursey J, Teijeiro A, et al. Interleukin-17A serves a priming role in autoimmunity by recruiting IL-1 β -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-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>.
- [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.000000000000031>.
- [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 interferon-gamma 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-Stockler 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, Hùe 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](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](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](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] Lefrançois 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] Lefrançois 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 IL-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 ROR γ t+ 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 ROR γ t 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+ROR γ t+ 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 TGF β Release. *PLoS One* 2016;11:e0161507.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161507>.
- [205] Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelman 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 ROR γ t+ and Helios+ Tregs via the MK2/3-mediated 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, Klopffleisch 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 $\gamma\delta$ 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, Dieffenbach 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-33-dependent 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-FcεRI 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, Pheesse 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-Błaszczak 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-κB 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 ST2-dependent 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 gene-environment-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. PPAR γ 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 amphiregulin-dependent manner. *Oncol Immunology* 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-ST2-mediated 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, Goepf 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, Grecis 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 nematode-infected 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-9-driven 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 D-mediated 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 japonicum*-induced 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](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* parasitocidal 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 parasitocidal... 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. Parasitocidal 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](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.jmglm.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](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 6-aminonicotinamide 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](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](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 albendazole-chitosan microsphere-based treatment for alveolar echinococcosis in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003950. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003950>.
- [389] Dvorožnáková 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](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, Elisondo 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 chitosan-praziquantel 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 scolical 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] Ezzatkah F, Khalaf AK, Mahmoudvand H. Copper nanoparticles: Biosynthesis, characterization, and protoscolical 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.ijisu.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.ijisu.2015.05.043>.
- [415] Salih TA, Hassan KT, Majeed SR, Ibraheem IJ, Hassan OM, Obaid AS. *In vitro* scolical 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 high-dimensional 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 high-dimensional 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-Myology, 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.

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

49 **KEYWORDS**

50 *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
54 *Echinococcus multilocularis*, a tapeworm of canids (especially foxes) [1]. Adults of *E. multilocularis*
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
57 proportion of infected humans will actually develop viable parasitic lesions [2]. Host and pathogen
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
65 hand-to-mouth route. In the digestive tract, eggs release an oncosphere, which accedes to the blood
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].

74 Host-parasite interactions in human tissues are highly complex and lead to various clinical
75 presentations. In most cases (detected e.g. upon species-specific serology), no parasitic lesion is
76 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
83 and aborted lesions in humans is often difficult. Currently, the best marker to assess viability of the
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**

Factor	Associated with parasite control	Associated with parasite development	References
Cell populations	M1 macrophages, polymorphonuclear, NK, Th1 and Th17 cells	M2 macrophages, Th2 and Treg cells	[4,11–18]
Cytokines	IFN- α , IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-17	IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, TGF- β 1, FGL-2	[4,11,15,19,20]
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 facts 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

126 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**

Population	Number of case reports	Number of cases in cohort studies	Progressive AE¹	References
SOT² recipients	48 ³	9 ⁴	Yes	[21,23–31]
HIV/AIDS	2	2	Yes	[21,24,32,33]
Chronic inflammatory and auto-immune disorders	3	42	Yes	[21,23,24,31,34–36]
Malignancies	-	72 ⁵	No	[21,23,24,31]
Paediatrics	21	20	Yes	[32,37–49]
Pregnancy	1	-	Suspected	[50]

132 ¹Progressive AE: unusually fast-growing or extensive AE

133 ²Solid organ transplant

134 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 ⁴Transplanted organs: 4 kidneys, 2 hearts, 1 liver, 2 not specified

137 ⁵ Includes 44 solid cancers, 12 haematological malignant diseases and 16 “malignancies” (not
138 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**

157 While HIV and *E. multilocularis* co-infection is often taken as an example of the opportunistic
158 behaviour of the parasite, only few cases have been reported to date. The first was published in
159 1997, and was diagnosed in a six-year-old girl with AIDS [32]. The clinical presentation displayed
160 multiple unusual features: the young age of the patient, the extensive parasite growth and the
161 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
183 (34%) had an autoimmune disease or an immunosuppressive therapy [24], a similar proportion as
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

187 could accelerate AE progression. Thus, same recommendations as for SOT recipients should be
188 applied to these patients. Other immunosuppressive therapies were observed in patients with
189 accelerated AE, such as rituximab (anti-CD20) [22,29,36], however they are mostly associated with
190 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**

231 Pregnancy is associated with major immunological changes, explaining the higher rate of
232 autoimmune and infectious diseases in pregnant women [61]. Concerning the course of AE in
233 pregnancy, only few data are available. An animal experiment showed an increased parasite growth
234 in pregnant mice compared to non-pregnant animals [62]. To our knowledge, only one case of AE in
235 pregnant woman has been reported so far [63]. The patient presented a secondary lesion in the
236 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
238 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,
240 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
244 immunity. Thus, populations at risk for aggressive AE are those exposed to long-term
245 immunosuppressive therapy such as cyclosporin, TNF- α inhibitors, or steroids, or with prolonged and
246 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
249 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
Patients with long-term immunosuppressive therapies¹	Pre-immunosuppression check-up for people living in endemic areas: abdomen imaging (US, CT-scan or MRI), species-specific anti- <i>E. multilocularis</i> serology 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

255 ¹ Especially SOT recipients regimen, TNF- α inhibitors and steroids

256 ² Including 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
267 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>.
- 271 [2] Gottstein B, Wang J, Boubaker G, Marinova I, Spiliotis M, Müller N, et al. Susceptibility versus
272 resistance in alveolar echinococcosis (larval infection with *Echinococcus multilocularis*). *Vet*
273 *Parasitol* 2015;213:103–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.029>.
- 274 [3] Vuitton DA, McManus DP, Rogan MT, Romig T, Gottstein B, Naidich A, et al. International
275 consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. *Parasite* 2020;27:41.
276 <https://doi.org/10.1051/parasite/2020024>.
- 277 [4] Vuitton DA, Gottstein B. *Echinococcus multilocularis* and its intermediate host: a model of
278 parasite-host interplay. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:923193.
279 <https://doi.org/10.1155/2010/923193>.
- 280 [5] Knapp J, Lallemand S, Monnien F, Felix S, Valmary-Degano S, Courquet S, et al. Molecular
281 diagnosis of alveolar echinococcosis in patients based on frozen and formalin-fixed paraffin-
282 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>.
- 285 [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
286 the Establishment of the *Echinococcus multilocularis* Metacestode in Mice. *Front Immunol*
287 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
289 polarization of macrophages by regulating the RhoA-MAPK signaling pathway and thus affects
290 liver fibrosis. *Bioengineered* 2022;13:8747–58.
291 <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2056690>.
- 292 [9] Joekel DE, Nur S, Monné Rodriguez J, Kronenberg PA, Kipar A, LeibundGut-Landmann S, et al.
293 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>.

- 296 [10] Wang J, Müller S, Lin R, Siffert M, Vuitton DA, Wen H, et al. Depletion of FoxP3+ Tregs improves
297 control of larval *Echinococcus multilocularis* infection by promoting co-stimulation and Th1/17
298 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>.
- 306 [13] Chuanshan Z, Wang H, Jing L, Hou X, Li L, Wang W, et al. Involvement of TIGIT in NK Cell
307 Exhaustion and Immune Escape in Patients and Mouse Model with Liver *E. multilocularis*
308 Infection. *Hepatology* 2021. <https://doi.org/10.1002/hep.32035>.
- 309 [14] Lechner CJ, Grüner B, Huang X, Hoffmann WH, Kern P, Soboslay PT. Parasite-specific IL-17-type
310 cytokine responses and soluble IL-17 receptor levels in Alveolar Echinococcosis patients. *Clin*
311 *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
317 echinococcosis through inhibition of VEGF-induced angiogenesis. *Vet Res* 2019;50:3.
318 <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0621-7>.
- 319 [17] Tappe D, Frosch M, Sako Y, Itoh S, Grüner B, Reuter S, et al. Close relationship between clinical
320 regression and specific serology in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in
321 different clinical stages. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:792–7.
- 322 [18] Gottstein B, Lachenmayer A, Beldi G, Wang J, Merkle B, Vu XL, et al. Diagnostic and follow-up
323 performance of serological tests for different forms/courses of alveolar echinococcosis. *Food*
324 *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
333 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-
337 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
343 echinococcosis in immunocompromised patients. *Food Waterborne Parasitol* 2019;16:e00060.
344 <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. *Hepato*
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. *Hepato* *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, Manton G-A, et al. Experience of
352 liver 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](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>.
- 381 [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>.
- 384 [38] Haskologlu S, Dogu F, Gollu Bahadır G, Akyuzluer S, Ciftci E, Altun D, et al. An Unexpected
385 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](https://doi.org/10.1016/S1568-9972(03)00006-5).
- 389 [40] Kern P, Bardonnnet K, Renner E, Auer H, Pawlowski Z, Ammann RW, et al. European
390 echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. *Emerg Infect Dis*
391 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
393 echinococcosis in Poland: 1990-2011. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e1986.
394 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001986>.
- 395 [42] Usubalieva J, Minbaeva G, Ziadinov I, Deplazes P, Torgerson PR. Human Alveolar Echinococcosis
396 in Kyrgyzstan. *Emerg Infect Dis* 2013;19:1095–7. <https://doi.org/10.3201/eid1907.121405>.

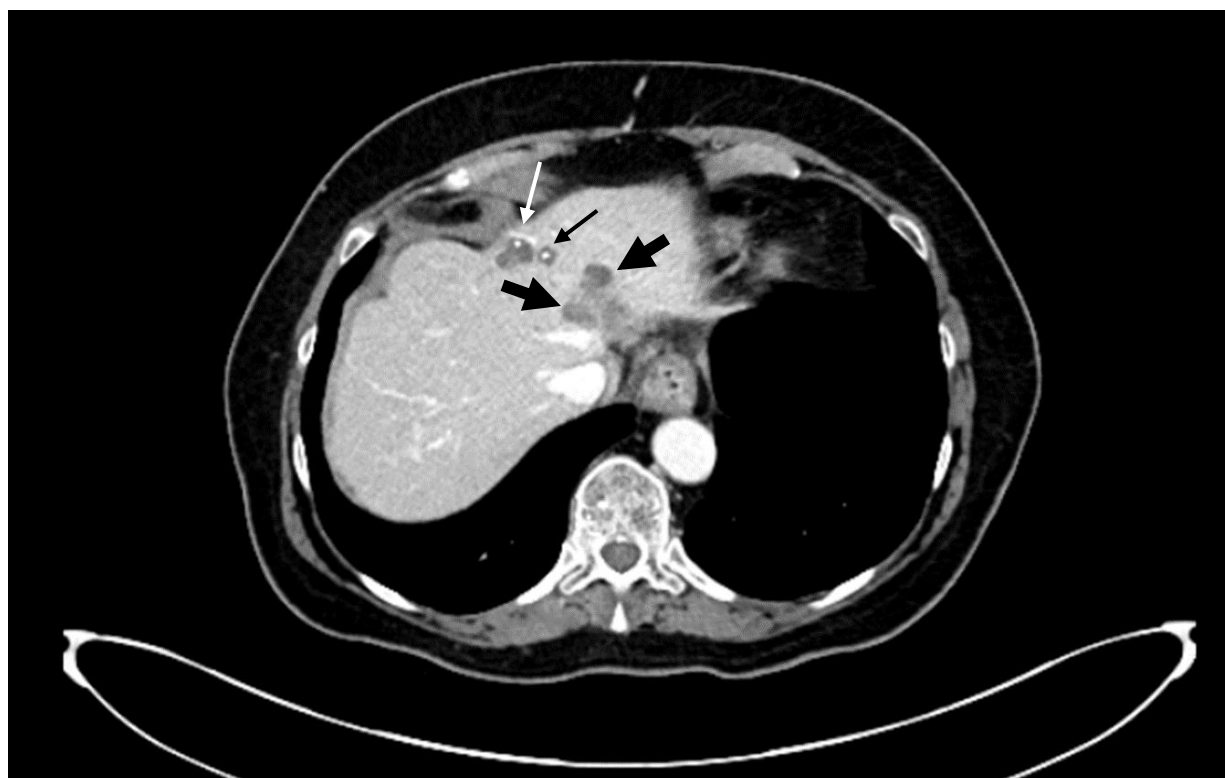
- 397 [43] Zheng C, Xue C, Han S, Li Z, Wang H, Wang L, et al. National Alveolar Echinococcosis Distribution
398 — China, 2012–2016. *China CDC Wkly* 2020;2:1–7.
- 399 [44] Jonaitytė E, Judickas M, Tamulevičienė E, Šeškutė M. Alveolar Echinococcosis in Children. *Case*
400 *Rep Pediatr* 2020;2020:5101234. <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 Miscal 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
434 with Liver and Lung Lesions in a Young Adult Patient: Case Report and Literature Review. Turk
435 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.0000000000007632>.
- 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
443 infection in unique extrahepatic vertebral alveolar echinococcosis. Infection 2017;45:365–8.
444 <https://doi.org/10.1007/s15010-016-0974-z>.
- 445 [60] Baldolli A, Bonhomme J, Yera H, Grenouillet F, Chapon F, Barbier C, et al. Isolated Cerebral
446 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 sigmoiditis 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- β 1.

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- β 1.

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* but 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.