



D. Agay, P. Pradeau, L. Edgard, A. Van Uye et J.C. Mestries

**RÉSUMÉ** – La présence de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 au niveau de la peau de sujets irradiés sous rayonnement neutronique a été étudiée par immunohistochimie au niveau des territoires d'entrée du rayonnement. Les résultats montrent la présence d'IL-6 dès le lendemain de l'irradiation. Pour des raisons expérimentales liées à la fréquence des prélèvements effectués, la mise en évidence de l'interleukine 6 au niveau de l'épiderme des sujets étudiés ne nous a toutefois pas permis de conclure à son éventuelle implication dans la pathogénie de la fibrose radio-induite et notre étude nécessitera des investigations supplémentaires.

**ABSTRACT** – In this study we investigated the *in situ* localization of IL-6 in mixed neutron-gamma irradiated baboons belly skin. Using immunohistochemical methods, we demonstrated the presence of IL-6 as early as the first day after the irradiation day. However experimental conditions did not allow us to conclude to a causality relation between irradiation and IL-6 cutaneous presence.

## INTRODUCTION

L'étude de la physiopathologie radio-induite nous a conduit à nous intéresser aux mécanismes inflammatoires précoces qui se développent chez les sujets après une irradiation corporelle totale par les neutrons. Après avoir mis en évidence des variations significatives des taux sériques d'interleukines pro-inflammatoires dans les premières heures suivant une irradiation, il nous a semblé intéressant de chercher si ces cytokines pouvaient également être impliquées au niveau local dans l'installation des lésions plus tardives, notamment au niveau cutané. C'est pourquoi nous avons mis en œuvre le dosage immunohistoenzymatique de l'IL-6, avant de poursuivre notre travail par la recherche de l'IL-1 $\alpha$  et du TGF- $\beta$  par une technique analogue. Les résultats préliminaires obtenus lors du dosage de l'IL-6 font l'objet de cet exposé.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les prélèvements de peau analysés ont été prélevés sur dix-sept babouins répartis en trois groupes : six animaux témoins, quatre animaux irradiés de face à 4 Gy et sept animaux irradiés de face à 6 Gy (N/ $\gamma$  = 5,5). Des biopsies de peau ont été réalisées sur tous ces sujets au niveau du ventre trente jours avant le début de l'expérimentation, puis un, deux, trois jours après l'irradiation et une, deux, trois et quatre semaines après. Le jour dit de l'irradiation, tous les animaux témoins et irradiés, ont été immobilisés sur un siège de contention à l'aide de bandage d'Elastoplast<sup>ND</sup>, la peau du ventre protégée par des compresses de gaze.

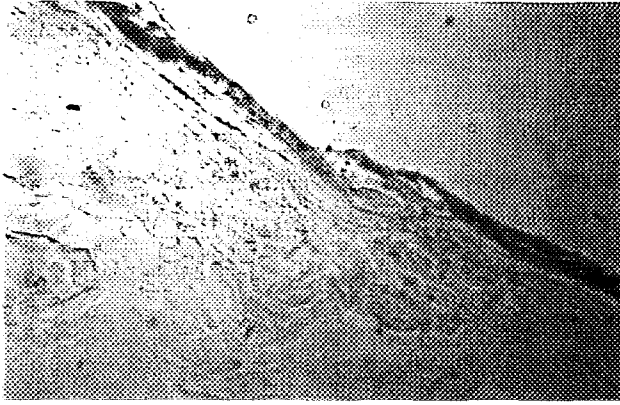
Les biopsies cutanées ont été congelées dans un bain d'isopentane à -40°C, puis aussitôt placées à -80°C. Les coupes effectuées à 7 $\mu$ m ont été recueillies sur des lames traitées au silanol. Après fixation 15 min au paraformaldéhyde et incubation des échantillons de peau avec du sérum de babouin et du sérum de lapin pendant

15 min, le marquage immunoenzymatique a alors été réalisé grâce à l'application pendant 25 min à 18°C d'un premier anticorps polyclonal de chèvre anti-hIL-6 (R&D Systems) dilué au 1/10 dans un tampon de PBS-Hépès en présence de saponine. La révélation a été faite en présence d'une immunoglobuline de lapin antichèvre biotinylée diluée au 1/200 dans le même tampon que précédemment pendant 20 min et d'un complexe d'amplification streptavidine-biotine couplé à la phosphatase alcaline (Dako). Entre chacune des étapes précédentes, les lames ont été rincées dans un bain tamponné pendant 5 min puis soigneusement séchées pour enlever toute trace de réactif. De plus, au niveau de chaque lame, la disposition de deux prélèvements de tissus effectués en même temps nous a permis d'effectuer chaque dosage parallèlement à son témoin négatif sans anticorps primaire. La présence d'IL-6 sur la coupe histologique étudiée se traduit par la coloration rouge de la New fuchsine choisie comme substrat de la réaction enzymatique. Après rinçage à l'eau distillée, les lames sont montées sous Aquatex (Merck) et lues au microscope photonique.

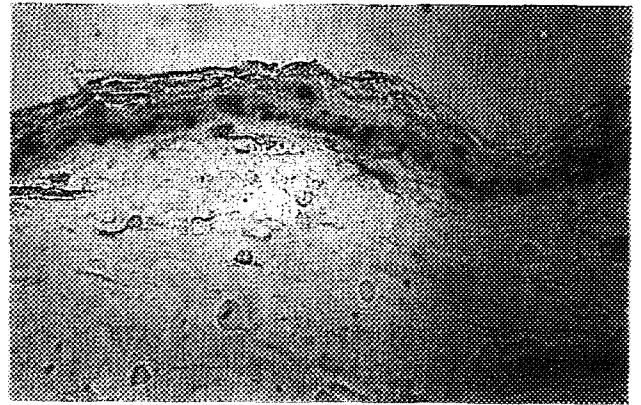
## RÉSULTATS

L'analyse des témoins négatifs effectués sur chaque lame en absence d'anticorps primaire anti-IL-6 montre une coloration rouge non spécifique au niveau des glandes sébacées chez la plupart des sujets. La fixation du complexe enzymatique à ce niveau n'est donc pas caractéristique de la présence d'IL-6 sur nos prélèvements.

Par ailleurs, la méthode de dosage mise en œuvre ne nous a pas permis de quantifier le marquage obtenu sur nos coupes tissulaires. Les résultats suivants sont donc qualitatifs. Quels que soient les lots de babouins, la présence d'IL-6 n'est pratiquement jamais mise en évidence dans les échantillons de peau prélevés trente jours avant leur mise sur siège (photographie 1). Dès



PHOTOGRAPHIE 1 – Peau témoin. Absence de marquage de l'IL-6.



PHOTOGRAPHIE 2 – Peau à J2. Marquage de l'IL-6 le long de la couche basale de l'épiderme.

le lendemain de l'entrée en expérimentation, toutes les biopsies de peau montrent la présence d'IL-6 au niveau épidermique aussi bien chez les singes témoins que chez les singes irradiés à 4 ou 6 Gy, à tous les temps de prélèvements étudiés (photographie 2). Le marquage est parfois diffus, mais plus généralement bien délimité en tâches réparties sur l'ensemble des couches cellulaires, de la couche basale à la couche cornée. Ces tâches punctiformes non superposables aux noyaux des cellules marquées correspondent certainement à des organites de synthèse ou de stockage intracytoplasmique. La coloration diffuse de l'ensemble de la couche épidermique pourrait signifier la présence d'IL-6 dans la matrice intercellulaire. Il n'existe pas de différence significative entre les images observées chez les babouins des trois lots ou entre les différents temps de prélèvement d'un même animal.

## DISCUSSION

Tout d'abord, l'absence de production importante d'IL-6 chez les babouins au niveau cutané à l'état basal paraît en relative contradiction avec les données cliniques rapportées chez l'homme où la présence d'IL-6 notamment au niveau dermo-épidermique est bien décrite (2, 3, 4). Ce résultat peut être en partie lié à une sensibilité limitée de notre méthode de dosage immunohistoenzymatique destinée à révéler de l'IL-6 de babouin à l'aide d'anticorps dirigés contre une molécule humaine.

En second lieu, la mise en évidence d'IL-6 dès le lendemain de l'entrée en expérimentation des sujets est le reflet de l'inflammation cutanée siégeant au niveau du ventre des sujets dès cette date. Chez les animaux témoins, l'inflammation présente dès (J1) ne pourrait être expliquée que par l'irritation locale due aux bandages de contention des animaux placés sur siège. Chez les animaux irradiés, les effets directs du rayonnement

neutronique s'y ajoutent certainement sans qu'il nous soit possible de définir la part relative de chaque agent causal.

De plus, nous devons noter que la cinétique des prélèvements qui avait été choisie pour étudier les différents facteurs susceptibles d'intervenir lors de l'installation de la fibrose radio-induite se révèle inadaptée à l'étude des cytokines pro-inflammatoires de cinétique rapide telles que l'IL-6, l'inflammation entretenue localement par les biopsies chirurgicales répétées étant suffisante par elle-même pour faire varier leur synthèse épidermique comme le montrent les résultats obtenus chez les animaux témoins. Il est toutefois intéressant de noter que les résultats des dosages locaux en IL-6 sont bien indépendants des taux sériques relevés chez les babouins aux mêmes dates (1). L'étude de l'intervention des cytokines pro-inflammatoires au niveau cutané nécessiterait donc des investigations supplémentaires garantissant l'indépendance des résultats vis-à-vis des conditions expérimentales. Ces précautions devront également être prises en compte lors des recherches d'IL-1 $\alpha$  et de TGF- $\beta$  que nous mettrons prochainement en œuvre pour compléter notre étude.

(C.R.S.S.A., La Tronche - Grenoble)

## RÉFÉRENCES

- 1 D. AGAY, J.C. MESTRIES, S. MARTIN et F. HÉRODIN – L'inflammation radio-induite : implication de l'interleukine 6, *Travaux Scientifiques C.R.S.S.A.*, 1992, 13, 19-22.
- 2 A. CASTELLS-RODELLAS, J.V. CASTELL, A. RAMIREZ-BOSCA, J.F. NICAOLAS, F. VALCUENDE-CAVERO et J. THIVOLET – Interleukin 6 in normal skin and psoriasis, *Acta Derm. Venereol.*, 1992, 72, 3, 165-168.
- 3 A. OXHOLM – Epidermal expression of interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in normal and immuno-inflammatory skin states in humans, *APMIS*, 1992, n° 24, 100, 1-32.
- 4 L.I. ROMERO and S.H. PINCUS – *In situ* localization of interleukin-6 in normal skin and atrophic cutaneous disease, *Arch. Allergy Immunol.*, 1992, 99, 1, 44-49.