

## Etude histochimique et histoenzymologique de l'infarctus expérimental du rat après ligature permanente ou temporaire de la coronaire gauche\*

J. P. Camilleri, J. N. Fabiani, A. Deloche et C. Gurdjian

Avec l'aide technique de Mme M. Douheret et  
M. M. Wolfelsperger (photographies)

Laboratoire d'Anatomie pathologique, U.E.R. Broussais-Hôtel-Dieu  
(Prof. ag. J. Diebold), Paris

Laboratoire d'Etude des Greffes et Prothèses valvulaires et cardiaques  
(Prof. ag. A. Carpentier) CNRS ERA 420, Paris

Reçu le 18 octobre 1974

Histochemical and Histoenzymatic Study of Experimental Myocardial Infarction  
in the Rat by Temporary and Permanent Ligation of the Left Coronary Artery

*Summary.* The evolution of experimental myocardial infarction in the Rat with or without revascularization has been studied histochemically and histoenzymatically in 56 animals sacrificed after 1, 6, 12, 24, 48 hrs and 7 days. Following permanent ischemia (14 animals), there appeared an extended transversal infarction marked by the complete disappearance of all phosphorylase activity (P-ase) after the first hour. During the first 6 hrs, changes appeared in succinodeshydrogenase (SDH) and cytochrome oxydase (Cyt-Ox). Glucose-6-phosphodeshydrogenase (G6PDH) persisted until lysis of the necrotic focus. It was possible to define a perinecrotic marginal area in which P-ase activity is absent and SDH is granular "G" in nature, characterized by continuous remodeling in the first 48 hrs.

Following temporary ischemia (42 animals) the evolution was marked by rapid tissue reactions and early regression of the marginal zones. After 48 hrs and 7 days of survival, the planimetric evaluation of the infarcted area shows a definite reduction in the size of the infarctus in 50% of cases following removal of the ligature after 6 hrs, and in 66% of cases following removal of the ligature after 1 hr. It would appear probable that the revitalization of certain myocardial areas may extend from the marginal zones as is suggested by the re-appearance in these zones several hrs after revascularization of P-ase and SDH activity. On the other hand, it is also true that the early restoration of blood flow does not always prevent the occurrence of an extended infarction. Certain recent observations have shown microcirculatory changes which are secondary to anoxia and should be studied further.

*Résumé.* L'évolution de l'infarctus myocardique expérimental du Rat avec et sans revascularisation est précisée par une étude histochimique et histoenzymologique de 56 animaux sacrifiés à 1, 6, 12, 24, 48 heures et 7 jours.

Après ischémie permanente (14 animaux) la ligature de la coronaire gauche à son origine donne un infarctus transmural étendu, de topographie antéro-latérale, marqué dès la première heure par la disparition complète de toute activité phosphorylasique (P-ase). Au cours des 6 premières heures, apparaissent les modifications de la succino-deshydrogénase (SDH) et de la cytochrome oxydase (Cyt-Ox). La glucose-6-deshydrogénase (G6PDH) persiste jusqu'à la lyse du foyer nécrotique. Surtout, il est possible de définir avec précision une zone périnécrotique, dite marginale, P-ase négative et SDH à activité granulaire "G", caractérisée par d'incessants remodelages au cours de 48 premières heures.

\* Nous remercions vivement le Dr. P. Ganter pour ses conseils qui nous ont été très utiles pour la rédaction définitive de ce travail.

Après ischémie temporaire (42 animaux), l'évolution est marquée par la rapidité des réactions tissulaires et la régression précoce des zones marginales. A la 48ème heure et après 7 jours de survie, l'évaluation planimétrique du territoire nécrosé montre une réduction notable de la taille de l'infarctus dans la moitié des cas après levée de ligature à la 6ème heure, et dans les deux tiers des cas après levée à la 1ère heure. Il paraît probable que la récupération de certains territoires myocardiques puisse se faire à partir des zones marginales, comme le suggère la réapparition dans ces zones des activités phosphorylasique et deshydrogénasique après plusieurs heures de revascularisation. A l'opposé, il est incontestable que le rétablissement même très précoce du flux sanguin n'empêche pas toujours la constitution d'infarctus étendus. Certaines observations récentes évoquent l'intervention de perturbations microcirculatoires, secondaires à l'anoxie, dont l'étude mérite d'être poursuivie.

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses publications ont été consacrées aux effets de l'ischémie aiguë sur le myocarde (Oliver *et al.*, 1972; Brachfeld, 1974). Les espoirs actuels de la chirurgie des coronaires, et les problèmes posés par la protection myocardique dans la chirurgie cardiaque moderne, expliquent l'intérêt croissant des cliniciens et des pathologistes pour cette question.

Beaucoup d'auteurs se sont adressés aux infarctus expérimentaux par la ligature d'une des branches des coronaires avec examen du cœur entier ou d'une zone d'irrigation terminale comme le pilier postérieur de la mitrale après ligature distale de la circonflexe (Sommers et Jennings, 1964). Malgré l'apport considérable des études histochimiques, histoenzymologiques et ultrastructurales, bien des inconnues persistent encore quant aux critères de viabilité de la cellule myocardique, au seuil d'irréversibilité des lésions, à la distribution hétérogène des altérations cellulaires au sein d'un territoire privé de son irrigation sanguine. La question essentielle est de savoir dans quelle mesure une revascularisation précoce peut réduire le foyer de nécrose et permettre la récupération des zones marginales non encore définitivement frappées dans leur métabolisme. Dans un travail antérieur, utilisant le Rat comme animal d'expérience, il nous est apparu que les effets du rétablissement du flux sanguin dans le territoire ischémique étaient étroitement dépendants de l'heure de la levée de la ligature (Fontaliran *et al.*, 1972). Il nous a semblé intéressant de compléter les données histopathologiques et électriques par une étude histochimique et histoenzymologique, pour mieux préciser les phases précoces du processus et le comportement métabolique des zones marginales avec ou sans revascularisation.

## Matériel et Méthodes

### *Choix de l'animal*

Nous avons choisi le Rat pour sa commodité, la possibilité de travailler sur de grandes séries, la relative facilité de l'intervention chirurgicale, la bonne tolérance de l'animal, la topographie précise et reproductible de l'infarctus obtenu. Cette étude concerne 56 rats Wistar mâles, d'un poids moyen de 250 gr, retenus sur une série de 110 animaux. Les animaux morts spontanément, les rares échecs de l'intervention, et tous les cas incomplètement étudiés ou comportant des défauts techniques ont été systématiquement éliminés.

### *Protocole chirurgical*

La coronaire gauche est liée à son origine selon la méthode de Johns et Olson (1954), simplifiée par Selye *et al.* (1960). L'intervention dure environ 3 minutes, ne nécessite pas d'assistance respiratoire. La mortalité reste élevée (35 % environ) liée plus à l'infarctus par insuffisance cardiaque aiguë qu'à la méthode elle-même. Pour créer une ischémie temporaire, la ligature est faite de façon que la traction sur un chef, laissé extériorisé, permette de défaire le nœud (Deloche *et al.*, 1972). Cette méthode permet donc de lever des ligatures tardivement sans réintervention. L'ablation de la ligature entraîne dans la quasi-totalité des cas une bonne réexpansion du lit artériel, comme le montrent les coronographies après injection de masses opaques et l'absence de thrombose au niveau de la ligature sur les contrôles histologiques. Un électrocardiogramme est enregistré au cours et au décours de l'intervention grâce à

des aiguilles piquées à la racine des quatre membres et dans la région précordiale. L'appareil enregistreur est un appareil multipiste (Electronique Appliquée). Les tracés obtenus permettent de vérifier la réalité de l'infarctus et d'étudier les modifications électriques après levée de la ligature coronaire.

Des animaux témoins, non opérés, et opérés mais non ligaturés, sont étudiés selon le même protocole.

#### *Protocole histo chimique et histo enzymologique*

Chez l'animal anesthésié à l'éther, le cœur est prélevé battant sans traumatisme et immédiatement plongé dans du sérum physiologique glacé. Il est ensuite très rapidement coupé transversalement à 0,5—0,6 cm de la pointe. L'un des fragments est fixé dans le liquide de Baker pour une étude histologique standard. Les colorations systématiquement effectuées sont les suivantes: hématéine-éosine-safran, trichrome au bleu d'aniline selon Masson, P.A.S., hématoxyline phosphotungstique de Mallory, hématéine-fuschine basique selon Lie (1971), von Kosai pour la recherche du calcium, Perls pour le fer.

Le fragment destiné à l'étude histo enzymologique est, après prélèvement, instantanément congelé dans un mélange acétone-carboglace à  $-80^{\circ}$ , et coupé au cryostat à 5  $\mu$ . Après une étude préalable ayant permis de tester sur ce matériel une quinzaine d'enzymes, nous nous sommes arrêtés à 4 d'entre eux, intéressés de façon variable au cours de l'ischémie et représentatifs de plusieurs grandes voies du métabolisme cellulaire:

- voie d'Embden Meyerhof pour la phosphorylase (P-ase)(Takeuchi, 1962);
- shunt des hexoses monophosphates pour la glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH)(technique modifiée de Hess, Scarpelli et Pearse, 1958);
- cycle de Krebs pour la succino-deshydrogénase (SDH)(Nachlas, Tsou, de Souza, Cheng et Seligman, 1957);
- chaîne respiratoire pour la cytochrome-oxydase (Cyt-Ox)(Burstone, 1961).

Pour chaque réaction enzymatique, les temps d'incubation sont identiques pour toute la série afin de pouvoir comparer des résultats d'un cas à l'autre. La lecture des coupes compare pour chaque cas l'aspect dans le territoire de la coronaire gauche privé d'irrigation sanguine, et dans le reste du myocarde, ceci par rapport à des rats témoins. L'intensité des réactions est appréciée dans chaque territoire selon une cotation grossière de 0 à ++++. Enfin, sur chaque section de cœur, les surfaces respectives des différentes zones identifiables sont calculées après projection sur une grille grâce à une méthode planimétrique simple, et exprimées en pourcentage de la surface totale des parois antérieure, latérale, postérieure et septale du ventricule gauche.

Sur les coupes voisines effectuées au cryostat, sont pratiquées des colorations des graisses (Oil Red O, Noir Soudan), une recherche du glycogène après post-fixation à l'alcool (P.A.S., amylase), une coloration par l'acridine orange avec examen en fluorescence.

#### *Répartition des animaux*

La répartition des animaux est la suivante:

Heure de la levée	Heure du sacrifice						
	1 h	6 h	12 h	24 h	48 h	7 jours	Total
Ligature permanente	2	2	1	3	3	3	14
Levée 1 heure	—	2	2	8	4	11	27
Levée 6 heures	—	—	2	2	4	4	12
Levée 12 heures	—	—	—	3	—	—	3
Total	2	4	5	16	11	18	56

Les animaux avec ligature permanente sont sacrifiés à 1, 6, 12, 24 et 48 heures et une semaine.

Nous nous sommes limités à des durées d'ischémie temporaire de 1 h, 6 h et 12 h, l'expérience nous ayant appris que les levées plus tardives entraînaient constamment une aggravation des lésions. Les animaux sont alors sacrifiés à 6, 12, 24, 48 heures et une semaine.

## Résultats

### *I. Etude histologique*

Les aspects histopathologiques des infarctus obtenus chez le Rat par ischémie permanente ou temporaire ont été exposés dans d'autres publications (Fontaliran *et al.*, 1972). Nos observations sont dans l'ensemble conformes aux descriptions antérieures.

Dans les *infarctus par ischémie permanente* (14 animaux), le territoire atteint intéresse dans la quasi-totalité des cas les faces antérieure et latérale du ventricule gauche, tout ou partie de sa paroi postérieure, rarement (2 cas) une partie du septum. L'infarctus est toujours transmural, ménageant seulement 2 à 3 couches de cellules myocardiques sous l'endocarde. L'atteinte des piliers est habituellement parcellaire. Avec les colorations conventionnelles (hématine-éosine-safran), les altérations histologiques ne sont significatives qu'à 6 heures (oedème, congestion capillaire, hyperéosinophilie des cellules myocardiques, aspect granuleux du cytoplasme avec parfois conservation de la striation transversale, noyaux rétractés ou pycnotiques). Parmi les diverses colorations effectuées (hématoxyline-phosphotungstique de Mallory, acridine-orange en fluorescence), seule l'hématoxyline-fuschine basique, récemment proposée par Lie (1971) semble donner des résultats après une heure d'ischémie. Toutefois, dans notre matériel, cette fuschinophilie paraît inconstante, très dépendante des temps de différenciation, et susceptible de donner des faux positifs. La comparaison des résultats avec les données de l'histoenzymologie impose quelques réserves dans l'application systématique de ce test. A 12 heures, les lésions sont caractéristiques, faisant alterner nécrose de coagulation, dégénérescence vacuolaire, myolyse, diapédèse leucocytaire. Les suffusions hémorragiques sont rares. Les bandes éosinophiles de contraction s'observent surtout en périphérie du foyer de nécrose. L'évolution des lésions est caractérisée par la rapidité des réactions de détersion aboutissant, dès la fin de la première semaine, au remplacement de la nécrose acidophile par un tissu de granulation (Fontaliran *et al.*, 1972).

Dans les *infarctus par ischémie temporaire* (42 animaux), les résultats dépendent de l'heure de la levée de ligature. Après 12 heures d'ischémie et 12 heures de revascularisation (3 cas), l'aspect est comparable aux infarctus par ischémie permanente de 24 heures. Il faut noter seulement l'importance des suffusions hémorragiques interstitielles. Après 1 ou 6 heures d'ischémie, les lésions observées à 6, 12, 24 et 48 heures (24 cas) comportent certains caractères communs qui permettent de les distinguer des infarctus par ischémie permanente. Le foyer de nécrose est plus nettement délimité des territoires voisins. Les modifications interstitielles sont particulièrement intenses: oedème intercellulaire, nombreux polynucléaires, suffusions érythrodiapédétiques. Les lésions cellulaires sont polymorphes. Des îlots de nécrose de coagulation sont mêlés à des altérations dégénératives diverses, avec nombreuses bandes transversales hyperéosinophiles de contraction, dislocation myofibrillaire. Ces lésions élémentaires sont mieux analysées après coloration par l'hématoxyline phosphotungstique de Mallory (PTAH). Dans 3 cas, les colorations électives du calcium montrent de fins dépôts granulaires intéressant des cellules isolées ou des groupes de cellules myocardiques,

surtout en périphérie du foyer de nécrose. L'évolution tardive de ces infarctus revascularisés rejoint celle des infarctus par ischémie permanente. A 7 jours (15 cas), le territoire nécrosé est remplacé par un tissu de granulation. Tout au plus, note-t-on la présence de pigment hémosidérinique témoignant des suffusions hémorragiques antérieures, la persistance dans certains cas d'ilôts de nécrose de coagulation non encore détergés, une plus grande intrication de zones cicatricielles et de territoires préservés constitués de cellules myocardiques hypertrophiques. L'essentiel réside dans les topographies comparées de ces différents types d'infarctus. Cette étude sera faite à partir des documents histoenzymologiques.

## *II. Etude histochimique et histoenzymologique*

A la lumière des documents histologiques, et compte-tenu des horaires choisis pour ce travail, l'évolution des lésions comporte trois phases: une phase de prénécrose jusqu'à l'apparition des premiers stigmates histopathologiques avec les techniques conventionnelles (6 premières heures), une phase de nécrose avec son cortège de réactions cellulaires et interstitielles (6 à 48 heures), et une phase de réparation et de cicatrisation (première semaine).

Nous envisagerons les altérations histochimiques et histoenzymologiques en deux étapes: les modifications précoces couvrant les phases de prénécrose et de nécrose (1 à 48 heures), les modifications tardives représentant le résultat du processus d'organisation des lésions (7 jours). Pour chaque étape, nous comparerons les résultats observés après ischémie permanente et temporaire. Ensuite, nous résumerons les modifications plus particulières observées en zone marginale et nous récapitulerons les résultats obtenus par évaluation planimétrique.

### *A. Modifications précoces (48 premières heures)*

*1. Infarctus par ischémie permanente.* La recherche des *graisses neutres* (Oil Red O, Noir Soudan) montre l'accumulation de fines gouttelettes, volontiers périnucléaires, dans les cellules myocardiques. Cette stéatose myocardique est pratiquement constante à la 6ème heure, surtout dans les zones périfocales.

La déplétion du *glycogène intramyocardique* est assez précoce dans le territoire privé d'irrigation sanguine. Dans de bonnes conditions techniques, il est possible de mettre en évidence, dès la première heure, des foyers disséminés ayant perdu leur charge glycogénique. En réalité, cette déplétion n'est étendue à tout le territoire ischémique qu'à la 6ème heure. Dans les mêmes délais, apparaissent des dépôts intra-cellulaires PAS positifs résistants à l'amylase, dont on discute l'origine endocellulaire et/ou circulante. Ces dépôts accompagnent l'hyperéosinophilie cytoplasmique. Notons que tout au long du processus, le réseau des cellules de Purkinje sous-endocardiques gardent une forte charge glycogénique.

*L'activité phosphorylasique-(P-ase)* est intense dans le myocarde normal. Elle se présente sous l'aspect d'une coloration bleu-violacé homogène. L'attaque par les amylases  $\alpha$  et  $\beta$  fait disparaître toute coloration. Dès la 1ère heure, l'activité enzymatique a totalement disparu dans la zone privée d'irrigation sanguine. La limite avec le territoire normal est découpée, abrupte, sans zone intermédiaire (Fig. 1).



Fig. 1. Infarctus par ischémie permanente sacrifié après une ischémie de 1 heure. Phosphorylase (P-ase). Disparition totale de l'activité enzymatique dans la zone ischémique et limite nette avec la zone périphérique.  $G = 63 \times$

La succino-déshydrogénase (SDH), enzyme mitochondriale montre une activité très importante dans le myocarde normal. L'utilisation du Nitrobleu de Tetrazolium (nitro BT) comme accepteur d'électrons, la révèle sous forme de dépôts denses bleu-noir de formazan (Fig. 2). Ces dépôts se font aux pôles des noyaux et le long des myofibrilles, selon une distribution finement linéaire longitudinale

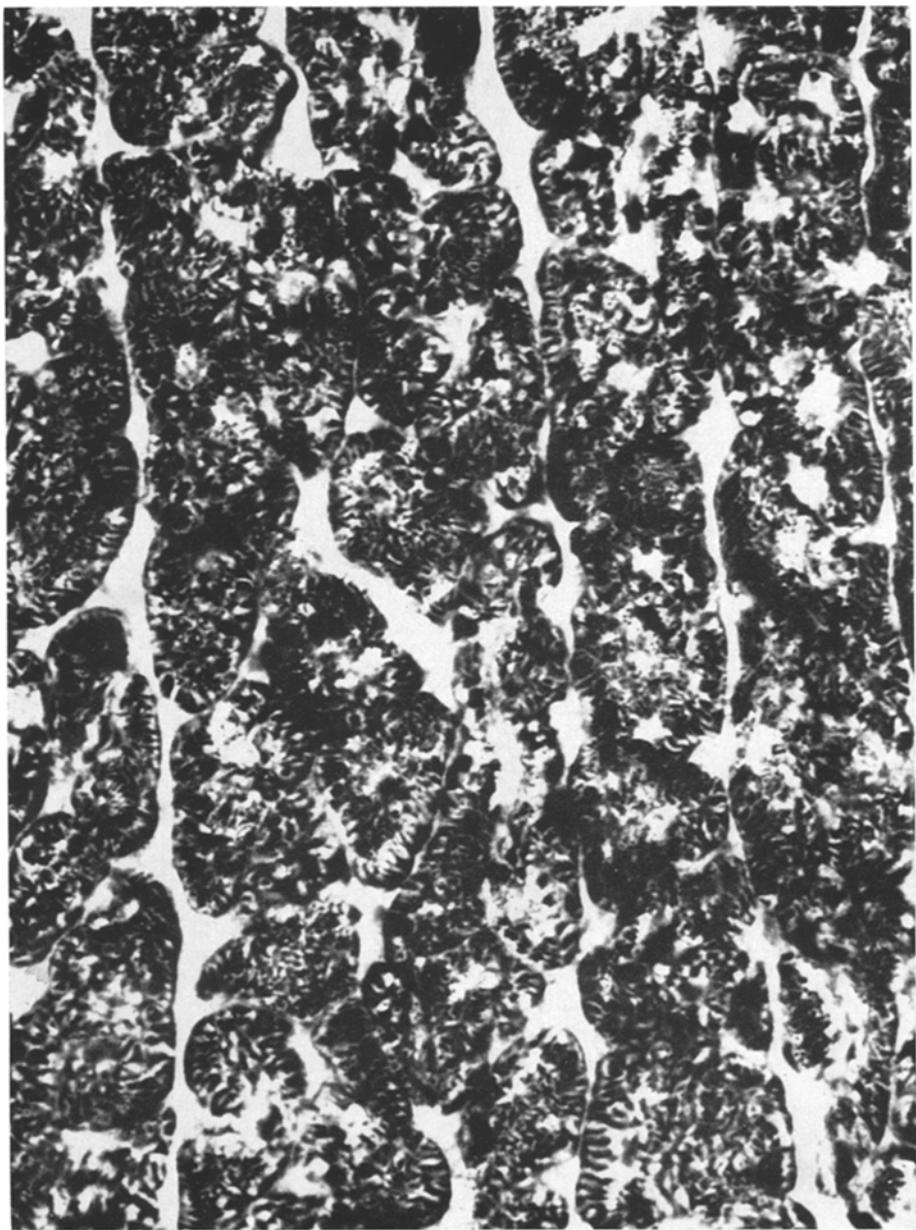


Fig. 2. Infarctus par ischémie permanente sacrifié à 6 heures. Activité succino-deshydro-génasique normale en territoire respecté.  $G = 675 \times$

associée à une striation transversale caractéristique. C'est la disposition dite fibrillaire «F» liée aux mitochondries (Nachlas *et al.*, 1957; Niles *et al.*, 1966). Les premières modifications observées dans le territoire ischémique consistent en une redistribution des dépôts de formazan sous forme de granules de 1 à 3  $\mu$  (Fig. 3 et 4). Cette disposition granulaire «G» est inconstamment observée dans

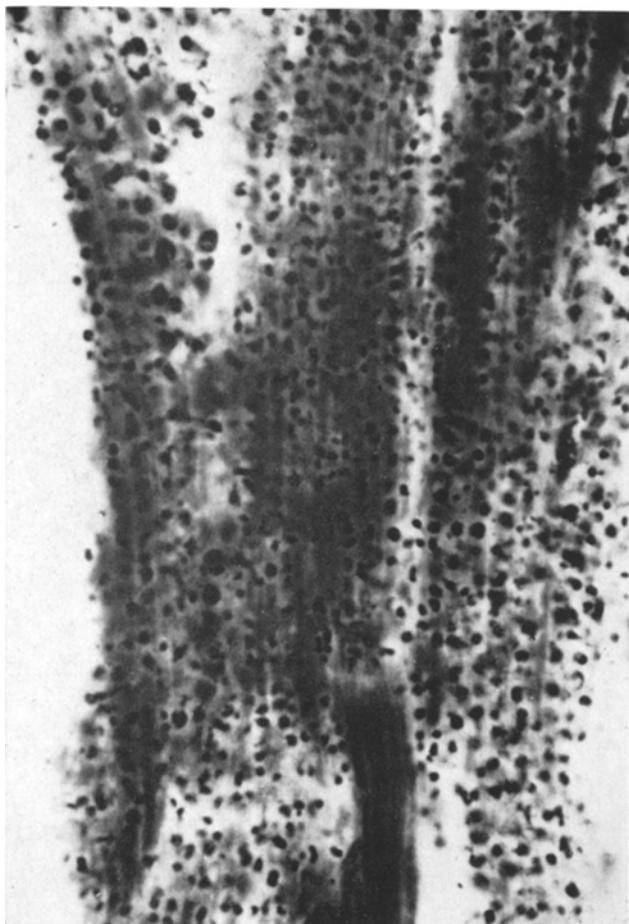


Fig. 3. Infarctus par ischémie permanente sacrifié à 6 heures. Activité succino-deshydro-génasique en zone périfocale. Coupe longitudinale de cellules myocardiques montrant un mélange d'activité fibrillaire persistante et d'activité granulaire anormale.  $G = 1500 \times$

la zone phosphorylase-négative dès la 1<sup>re</sup> heure. A 6 heures, on distingue très nettement trois zones. La zone centrale de nécrose, habituellement cantonnée à la paroi antérieure, est marquée par une dissociation des cellules myocardiques qui sont rétractées, occupées par des mottes compactes très denses de formazan. Autour de ce territoire, qui répond en histologie conventionnelle à des lésions de dégénérescence acidophile, persiste une large zone, surtout développée au niveau des parois latérale et postérieure du ventricule gauche, et caractérisée par une disposition granulaire «G» des dépôts de formazan. Cette zone P-ase négative et SDH de type granulaire «G» peut correspondre à la zone marginale ischémique (Fig. 5 et 6). A 24 et surtout 48 heures, la zone de nécrose perd toute coloration, tend à s'étendre aux dépens de la zone dite ischémique. A 48 heures, il ne persiste plus qu'une zone de nécrose SDH négative et P-ase négative sans territoire in-

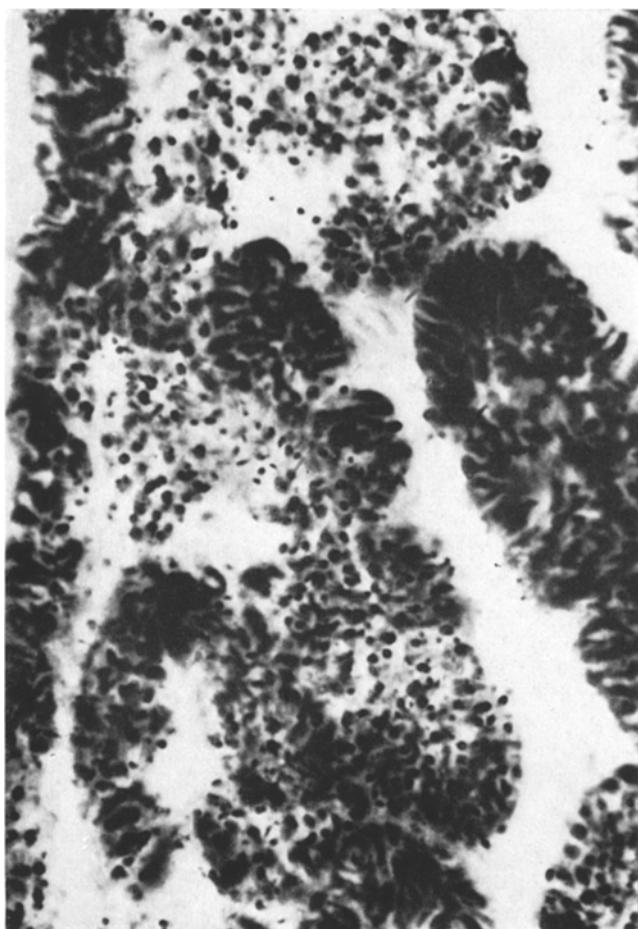


Fig. 4. Même cas. Succino-deshydrogénase en zone périfocale. Aspect sur une coupe transversale des faisceaux myocardiques.  $G = 1500 \times$

termédiaire. Au contact de cette zone, le myocarde montre une intense activité phosphorylasique (Fig. 7).

La *cytochrome oxydase* (Cyt-Ox) est aussi une enzyme mitochondriale. Son activité se présente dans le myocarde normal sous l'aspect de fines granulations brun-rouge localisées le long des myofibrilles. Dans le territoire ischémique, on note une nette diminution d'activité à 6 heures. Dans la zone de nécrose, les cellules myocardiques prennent un aspect rétracté et dense, puis perdent toute coloration. En périphérie, les sites d'activité prennent souvent un aspect grossièrement granulaire. L'évolution ultérieure est pratiquement superposable à celle de la SDH.

La *glucose-6-phosphate-déshydrogénase* (G6PDH) montre une faible activité dans le myocarde normal. Cette activité persiste plusieurs heures dans le foyer ischémique, pour disparaître au moment de la lyse du foyer nécrotique (24—

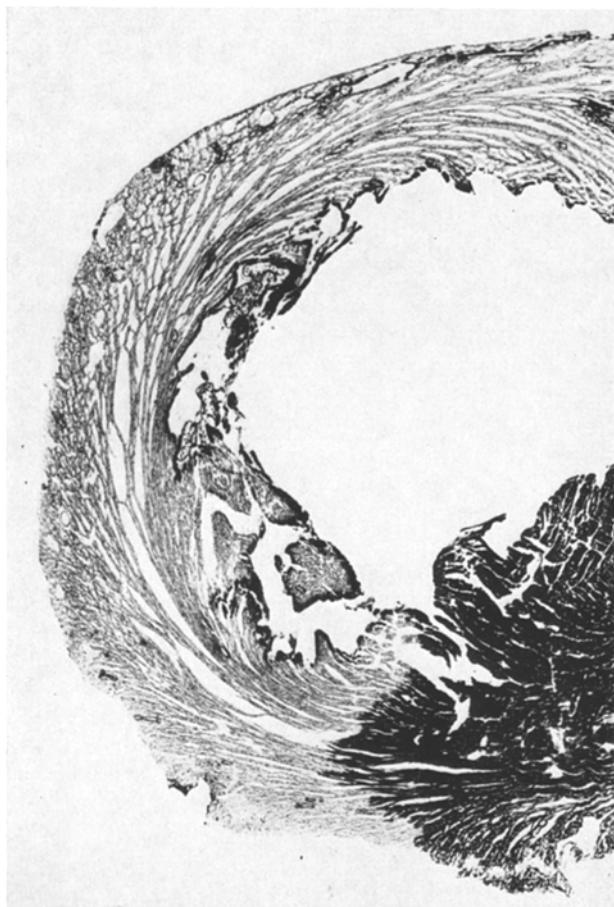


Fig. 5. Infarctus myocardique par ischémie permanente. Sacrifice à la 6ème heure. Disparition complète de toute activité phosphorylasique dans le territoire ischémique laissant persister un fin liseré positif sous-endocardique.  $G = 13,5 \times$

48 heures). A 48 heures, on note un renforcement de l'activité enzymatique dans les zones périfocales.

Il est ainsi possible, par comparaison des activités histoenzymatiques étudiées, de définir beaucoup plus nettement qu'avec les colorations histologiques conventionnelles trois zones distinctes: une zone centrale de nécrose, une zone marginale dite ischémique, et le myocarde à distance. La zone phosphorylase négative semble épouser dès la première heure la topographie quasi définitive de l'infarctus. Par contre, les autres activités enzymatiques (SDH, Cyt-Ox) montrent, à l'intérieur de ce territoire, d'importants remaniements au cours des 48 premières heures, essentiellement marqués par l'extension de la zone de nécrose et la réduction de la zone marginale P-ase négative et SDH d'activité granulaire «G». Les résultats de l'évaluation planimétrique de ces différents

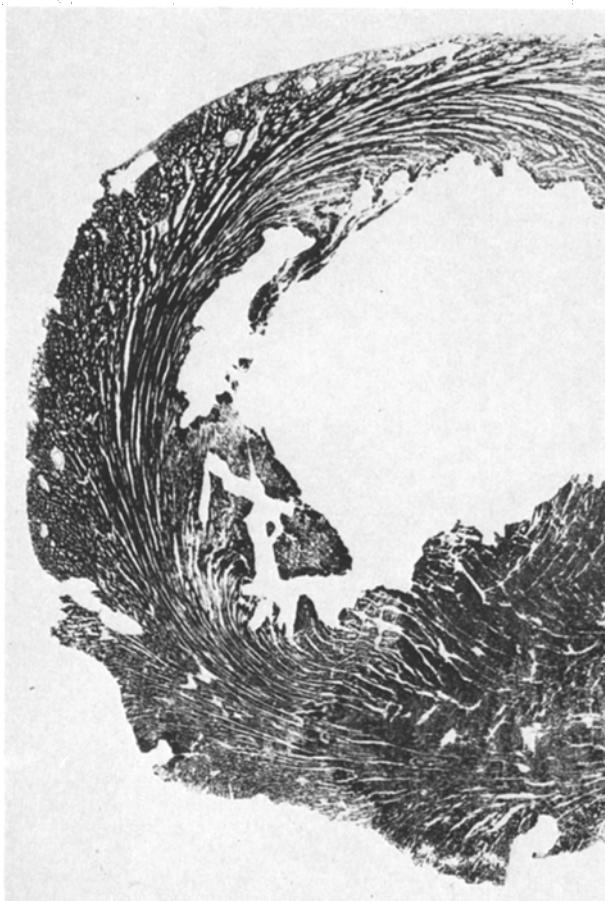


Fig. 6. Même cas. Même territoire. Succino-deshydrogénase (SDH). Apparition entre la zone normale et la zone de nécrose intramyocardique d'une zone plus pâle montrant une activité intermédiaire. Ce territoire s'inscrit sur la photographie précédente dans la zone P-ase négative (= zone marginale ou ischémique).  $G = 13,5 \times$

territoires par rapport à la surface projetée totale des parois antérieure, latérale, postérieure et septale du ventricule gauche, sont consignés dans un tableau général (Tableau 1). Le petit nombre de cas interdit toute tentative de calcul statistique. Disons que globalement la zone P-ase négative occupe environ 55 à 70% de la surface totale. La zone marginale est nettement définie à 6 heures (25 à 35%). Elle tend à décroître (20—25% à 12 heures, 10—15% à 24 heures, 0% à 48 heures) tandis que la zone de nécrose s'étend progressivement.

2. *Infarctus par ischémie temporaire*. L'accumulation dans les zones péri-focales de fines gouttelettes de graisses neutres soudanophiles, et la déplétion glycogénique dans le territoire privé d'irrigation sanguine, sont observées de façon à peu près comparable dans les infarctus par ischémie temporaire ou permanente.



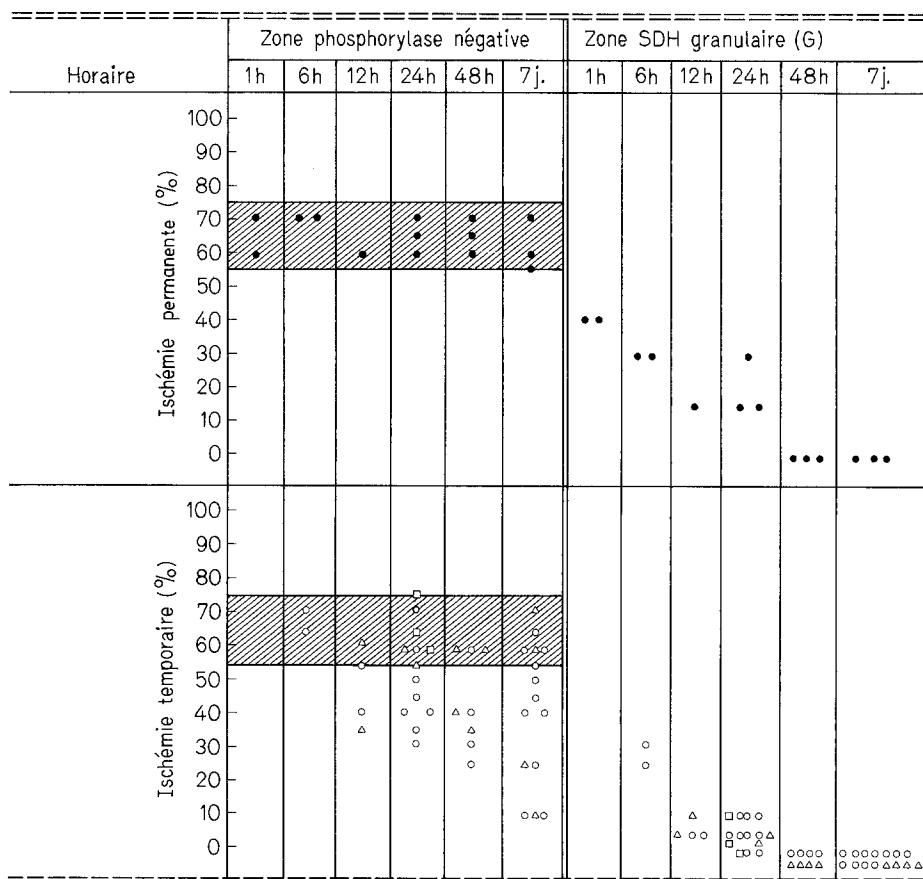
Fig. 7. Infarctus par ischémie permanente. Sacrifice à 48 heures. Succino-deshydrogénase (SDH). Le territoire de l'infarctus est dépourvu de toute activité enzymatique. La cavité ventriculaire est soulignée par 4 à 5 couches de cellules myocardiques ayant conservé une activité normale. Le territoire périfoveal, à droite de la figure, montre une activité enzymatique très intense. Il persiste en pleine nécrose deux petits îlots de cellules ilôts de cellules myocardiques actives.  $G = 34 \times$

Les modifications des diverses activités enzymatiques explorées (P-ase, SDH, Cyt-Ox, G6PDH) méritent d'être examinées en fonction de la durée totale de survie (temps d'ischémie et de revascularisation compris), par comparaison avec des durées égales d'ischémie permanente.

A 6 heures (2 animaux), l'aspect des infarctus levés à la première heure est tout à fait superposable à celui des infarctus par ischémie permanente de 6 heures.

Tableau 1. Etendue des différents territoires en fonction de l'activité enzymatique (P-ase et SDH); (exprimée en pourcentage de la surface projetée totale du ventricule gauche)

- Ischémie permanente, ○ levée 1 heure, ▲ levée 6 heures, □ levée 12 heures



A 12 et 24 heures (17 animaux), la zone P-ase négative est identique aux infarctus par ischémie permanente dans 9 cas (55—75%), discrétement diminuée dans 2 cas (45—50%), et nettement inférieure dans 6 cas (30—40%). Avec la succino-deshydrogénase, le fait remarquable est la réduction notable après revascularisation de la zone à activité granulaire «G» (5 à 10% au lieu de 10 à 25% après ischémie permanente). A 24 heures, la zone marginale P-ase négative et SDH granulaire est réduite à quelques foyers disséminés, ménagés entre l'infarctus et le myocarde à activité déshydrogénasique normale. Ainsi, dans les cas comportant une topographie globale comparable à celle des infarctus par ischémie permanente, ces constatations suggèrent que la nécrose a progressé plus vite en cas de revascularisation. C'est le cas des 3 infarctus levés à la 12ème heure et de 6 des 14 infarctus levés à 1 ou 6 heures. Dans les autres cas (8 animaux) montrant une diminution plus ou moins marquée du territoire lésionnel, la réduction s'est effectuée principalement aux dépens de la zone marginale à activité SDH granulaire G, avec ou sans stabilisation du foyer de nécrose. Le

détail des résultats en fonction de la durée de l'ischémie et de la revascularisation figure dans le tableau 1.

A 48 heures (8 animaux) toute activité enzymatique adisparu du territoire de l'infarctus. La topographie de la zone muette est superposable, avec la phosphorylase, la succino-déshydrogénase et la cytochrome-oxydase. Il n'existe plus de zone marginale à activité SDH de type granulaire. Au contraire, les territoires périfocaux, les couche sous-endocardiques, certains îlots sous-épicardiques comportent un renforcement de toutes les activités enzymatiques étudiées. Dans 3 cas (1 levée à 1 heure et 2 levées à 6 heures), la taille de l'infarctus est comparable à celle des infarctus par ischémie permanente (60%). Dans 5 cas (3 levées à 1 heure et 2 levées à 6 heures), la taille est partiellement réduite (25 à 45%).

#### B. Modifications tardives (7 jours)

1. *Infarctus par ischémie permanente* (3 cas). A la fin de la première semaine, la nécrose de coagulation est remplacée par un tissu de granulation en voie d'organisation conjonctive, dans lequel persistent encore de rares polynucléaires, des cellules mononucléées surtout macrophagiques, parfois de petites suffusions sanguines. La paroi est nettement amincie et marque souvent à cet endroit une ébauche de soufflure de la cavité ventriculaire.

A cette date, les cellules myocardiques périfocales ont repris une charge glycogénique normale et ne comportent plus de stéatose. La présence de graisses neutres peut encore être démontrée dans certaines cellules macrophagiques du tissu de granulation.

L'activité phosphorylasique est nulle dans la zone de l'infarctus et très intense dans les territoires marginaux. Une discrète activité succino-dehydrogénasique est retrouvée sous forme de fins dépôts de formazan dans les cellules conjonctives et les cellules musculaires lisses des vaisseaux. Les cellules myocardiques marginales montrent par contre une importante activité enzymatique. Tout le cytoplasme des cellules hypertrophiées est intensément et uniformément coloré en bleu. La diffusion des dépôts de formazan efface la topographie mitochondriale caractéristique de l'activité normale. Toute activité cytochrome oxydasique a habituellement disparu du territoire de l'infarctus. Seules les cellules conjonctives montrent une discrète activité enzymatique sous forme de fins dépôts bruns finement granulaires. La glucose 6 phosphate deshydrogénase montre une activité nettement accrue dans les zones marginales, par rapport aux rats témoins.

Au plan topographique, il existe une superposition entre les aspects observés après coloration par l'HES et les réactions enzymologiques (Fig. 8). L'étendue des 3 cas étudiés selon ce protocole est de 55, 60 et 70% (Tableau 1).

2. *Infarctus par ischémie temporaire* (15 cas). Les infarctus par ischémie temporaire diffèrent des précédents par la distribution des lésions. Après rétablissement du flux sanguin à la 1ère heure (11 cas) ou à la 6ème heure (4 cas), nous avons obtenu dans 6 cas un infarctus transmural étendu identique aux lésions non revascularisées (55 à 70%), dans 4 cas un infarctus transmural localisé de topographie le plus souvent antérieure (35 à 50%) (Fig. 9), dans 5 cas un in-



Fig. 8. Infarctus par ischémie permanente. Sacrifice à 7 jours. Succino-deshydrogénase (SDH). La quasi-totalité de la paroi du ventricule gauche est amincie, remplacée par un tissu de granulation respectant un fin liseré sous-endocardique de cellules myocardiques actives.

Persistance d'un territoire normal au niveau du pilier.  $G = 14 \times$

farctus intramural ou sous-endo cardique nettement réduit (10 à 30 %) (Fig. 10 et 11). Les résultats en fonction de la durée d'ischémie sont détaillés dans le tableau 1. Le fait saillant de ces infarctus limités, surtout sous-endocardiques ou intramuraux, est leur caractère hétérogène, disséminé, mêlant des foyers cicatriciels de taille variable et de larges îlots de cellules myocardiques métabolique cicatriciels de taille variable et de larges îlots de cellules myocardiques métaboliquement actives (Fig. 12). Cette intrication est particulièrement nette en périphérie, dans la zone sous-épicardique notamment au contact des vaisseaux, et au niveau des piliers en totalité ou partiellement épargnés. La cavité cardiaque est toujours soulignée par 2 ou 3 couches de cellules myocardiques respectées. Notons la topographie antérieure, ou antérolatérale, pratiquement constante de ces infarctus réduits.



Fig. 9. Infarctus myocardique par ischémie temporaire de 1 heure. Sacrifice à 48 heures. Succino-deshydrogénase. Présence au niveau de la paroi antéro-latérale d'un infarctus transmural réduit, respectant la paroi postérieure.  $G = 18 \times$

#### C. Modifications enzymatiques en zone marginale

Les données histoenzymologiques permettent, dès la 6ème heure, de définir nettement, entre l'infarctus et le myocarde normal à distance, une zone marginale de comportement histoenzymologique particulier. A 6 heures, cette zone P-ase négative et SDH granulaire «G» occupe entre le tiers et la moitié du myocarde privé d'irrigation sanguine. Elle diminue rapidement au cours des 24—48 premières heures. En cas de revascularisation précoce (levée de ligature à 1 ou 6 heures), ce territoire marginal semble disparaître plus rapidement, en moins de 24 heures. A la fin de la première semaine, avec ou sans revascularisation, la zone périfocale montre une augmentation des enzymes de la glycolyse et du shunt des hexoses monophosphates (P-ase et G6PDH), par rapport aux rats témoins. L'activité SDH est intense et diffuse (Tableau 2).



Fig. 10. Infarctus par ischémie temporaire de 1 heure. Sacrifice à 7 jours. Succino-deshydrogénase (SDH). Petit infarctus réduit, cantonné à la zone sous-endocardique, sans amincissement pariétal.  $G = 14 \times$

#### D. Etendue des infarctus par ischémie permanente ou temporaire

Nous avons comparé l'aspect des lésions obtenues par ischémie permanente ou temporaire, en fonction de la durée de survie. Il faut aussi corréler l'étendue de l'infarctus estimée par méthode planimétrique à la durée de l'ischémie. Les résultats exposés plus haut ayant montré que les modifications histoenzymologiques subissaient d'importantes fluctuations au cours des 48 premières heures, nous ne retiendrons ici que les animaux sacrifiés à 48 heures et à une semaine, soit 29 animaux (Tableau 3). Par référence aux infarctus par ischémie per-

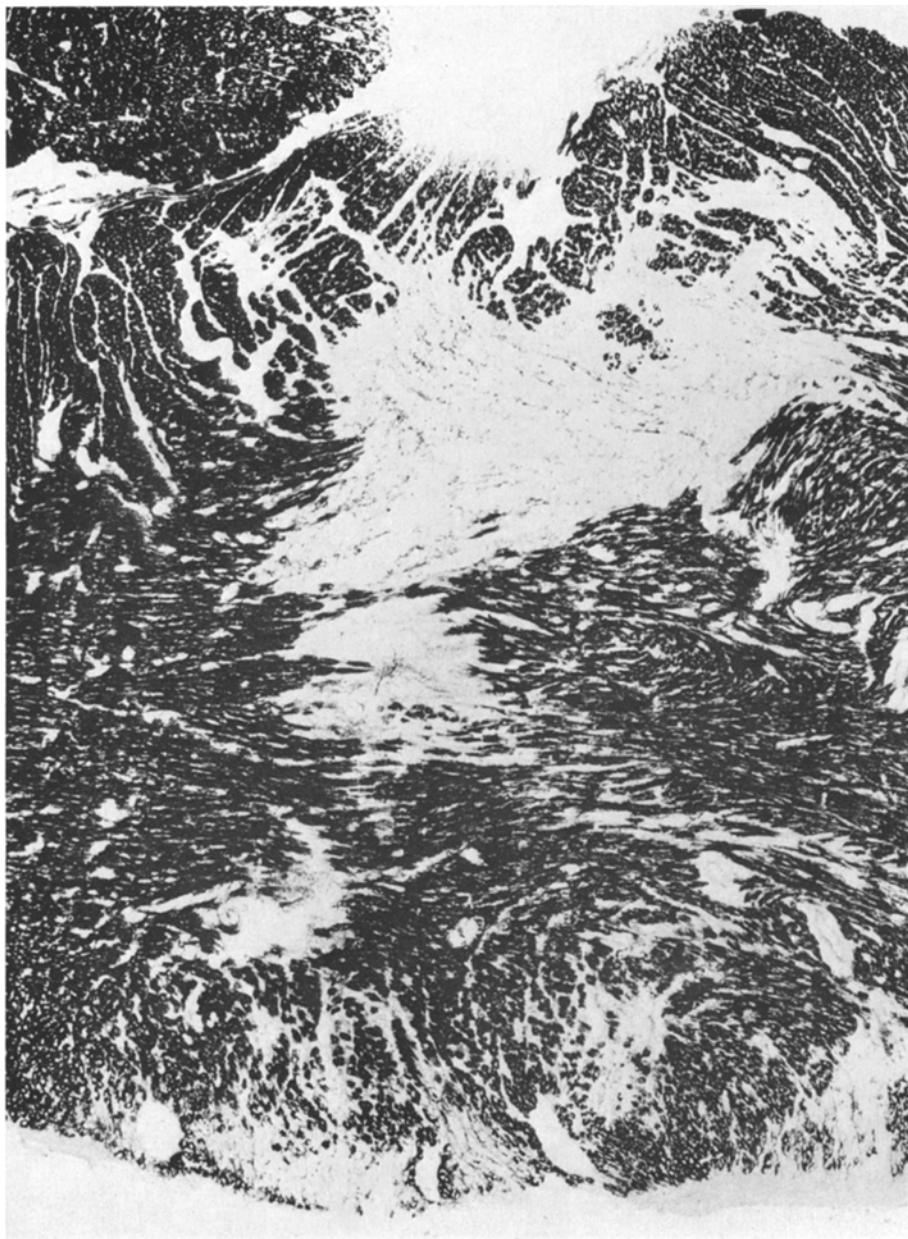


Fig. 11. Même cas que la Fig. 10. Détail sur l'infarctus sous-endocardique. Les deux tiers sous-épicardiques de la paroi montrent une intrication très étroite entre les îlots cicatriciels et les plages myocardiques ayant conservé une activité succino-deshydrogénasique normale.  $G = 37 \times$

manente, le rétablissement du flux sanguin permet d'obtenir une réduction modérée ou importante de la taille de l'infarctus dans la moitié des cas pour des levées de ligature à 6 heures, et dans les 2/3 des cas pour des levées à la 1<sup>re</sup> heure. Le nombre des cas est dans chaque groupe trop limité pour permettre une appréciation statistique et les chiffres donnés n'ont qu'une valeur indicative.

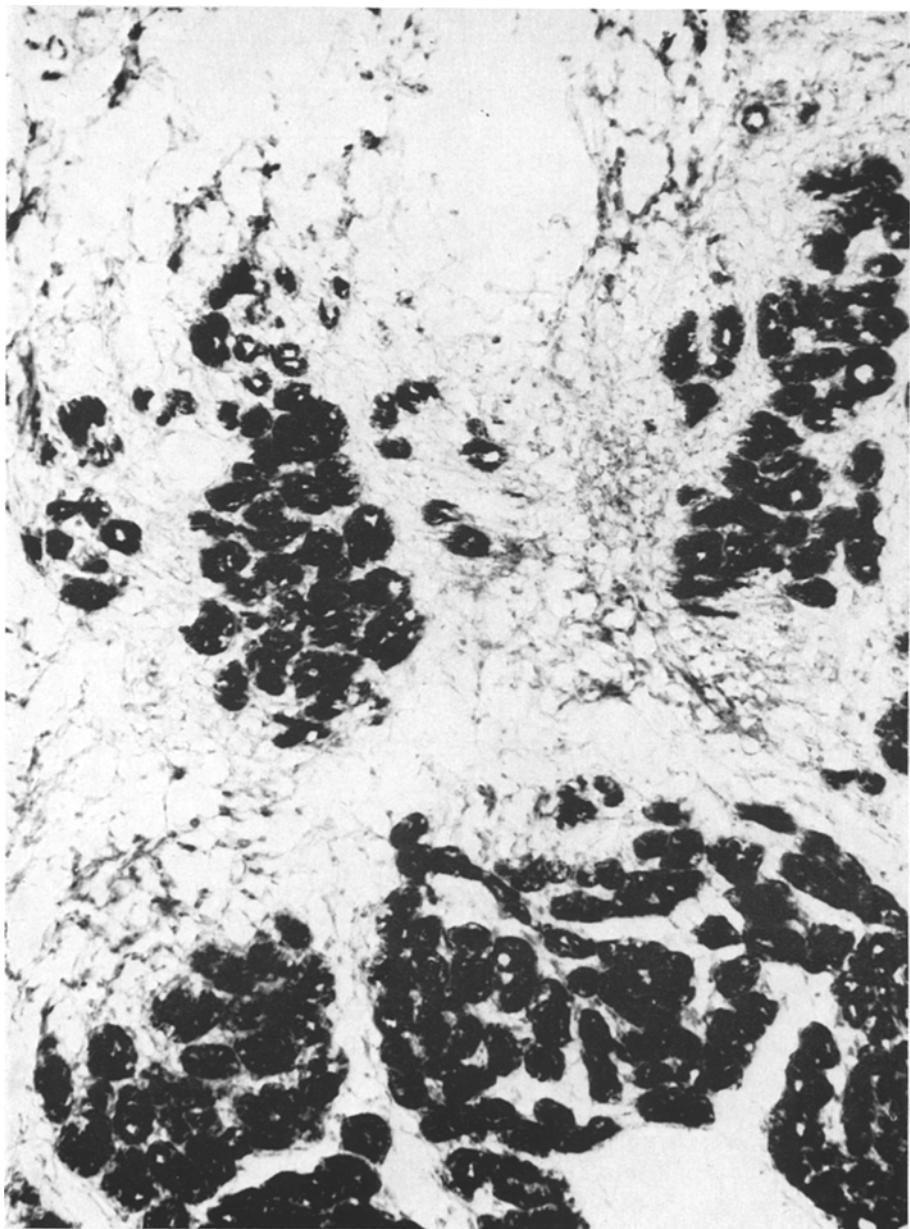


Fig. 12. Infarctus par ischémie temporaire de 6 heures. Sacrifice à 7 jours. Succino-deshydrogénase (SDH). Limite de l'infarctus montrant un mélange très étroit de zones nécrosées et de îlots de cellules myocardiennes englobées ayant conservé une intense activité enzymatique.  $G = 225 \times$

#### Commentaires

La ligature de la coronaire gauche à son origine permet d'obtenir chez le Rat un infarctus de topographie antéro-latérale étendue et transversale, caractérisé par la rapidité des réactions tissulaires. Nos observations rejoignent à cet égard celles d'autres auteurs (Mallory *et al.*, 1939; Selye *et al.*, 1960). La bonne repro-

Tableau 2. Infarctus par ischémie permanente. Activités enzymatiques en zone marginale (ZM)

Horaire	P-ase		SDH		Cyt-Ox		G6PDH	
	ZM	Nl	ZM	Nl	ZM	Nl	ZM	Nl
1 h	0	+++	+ à +++	+++	++	+++	++	+++
6 h	0	+++	+(G)	+++	+	+++	++	+++
12 h	0	+++	+(G)	+++	+	+++	+	+++
24 h	0	+++	+(G)	+++	+	+++	+	+++
48 h	++ à +++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7 jours	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+++
			(diffus)					

ZM = zone marginale, Nl = myocarde normal, 0 à +++ = activité enzymatique, ++ = activité normale, G = granulaire.

Tableau 3. Etendue de l'infarctus (exprimée en pourcentage de la surface projetée totale du ventricule gauche); en fonction de la durée de l'Ischémie (29 animaux)

	48 heures			7 jours		
	55/70 %	35/50 %	10/30 %	55/70 %	35/50 %	10/30 %
Ligature permanente	3	0	0	3	0	0
Levée 1 heure	1	1	2	4	4	3
Levée 6 heures	2	2	0	2	0	2

ductibilité des lésions est un des avantages du Rat comme animal d'expérience. Très tôt les auteurs se sont adressés aux techniques histochimiques pour tenter de mettre en évidence les lésions prénécrotiques qui échappent habituellement aux techniques histologiques conventionnelles. Les premiers travaux concernent les modifications de la charge glycogénique et l'accumulation de graisses neutres dans le territoire privé d'irrigation sanguine (Yokoyama *et al.*, 1955; Wartman *et al.*, 1956; Klionsky, 1960; Shnitka et Nachlas, 1963). Mais ce sont surtout les méthodes histoenzymologiques qui sont apparues les plus intéressantes. Elles ont pris, à côté des études ultrastructurales, une place capitale dans l'approche des altérations précoces de l'ischémie (Kent et Diseker, 1955; Kaufman *et al.*, 1959; Neoral *et al.*, 1959; Hecht, Korb et David, 1961; Shnitka et Nachlas, 1963; Hecht, 1964; Bajusz et Jasmin, 1964; Fine, Morales et Scerpella, 1966; Seiferth, 1967), et d'autres cardiopathies expérimentales (Bajusz et Jasmin, 1963; Niles, 1964; Niles, 1968; Kakari, 1970; Hecht, 1971). Les aspects observés doivent être interprétés à la lumière des données biochimiques plus précises et quantitatives, mais l'avantage principal de l'histoenzymologie est d'ordre topographique et structural. Il faut savoir aussi que certaines images observées sont en réalité des artefacts liés aux conditions de la mise en évidence des activités enzymatiques cellulaires en histoenzymologie: temps d'incubation, solubilité des enzymes, diffusion dans le milieu d'incubation, pénétration du substrat,

rôle de la perméabilité cellulaire (Hecht, 1971). L'essentiel est la reproductibilité des résultats. L'intérêt des protocoles utilisant le cœur entier est de pouvoir comparer sur une même section tissulaire le résultat coloré de la réaction enzymatique dans le territoire ischémique et dans le reste du myocarde normalement irrigué.

Parmi les réactions enzymatiques choisies pour ce travail, la phosphorylase est la première atteinte. Ceci a été montré pour la première fois par Bajusz et Jasmin (1964), puis confirmé par d'autres auteurs (Fine et Morales, 1966; Jaaskelainen, 1966; Seiferth, 1967; Krug *et al.*, 1967; Hecht, 1971). Il est habituellement admis que toute activité phosphorylasique a disparu après 5 minutes d'ischémie. Dans notre matériel, l'activité phosphorylasique est nulle, dans tout le territoire de la coronaire ligaturée, après une ischémie permanente d'une heure. Tout se passe comme si, dès la première heure, la zone P-ase négative déliminait de façon quasi-définitive la topographie de l'infarctus. Rappelons à ce propos que les analyses biochimiques montrent au contraire, dès les premières minutes de l'ischémie, une augmentation de l'activité phosphorylasique par transformation de la phosphorylase inactive *b* dans sa forme active *a* (Dobson et Mayer, 1973). Cette activation de la glycolyse va de pair avec la baisse des réserves glycogéniques. Pour certains (Schulze, 1969; Hecht, 1971), la déplétion enzymatique observée dans le territoire lésé serait due à l'augmentation de la perméabilité cellulaire et à la diffusion dans le milieu d'incubation d'une enzyme cytoplasmique très soluble. L'utilisation comme substrat de dextrans de haut poids moléculaire paraît pouvoir s'opposer à cette diffusion (Meijer, 1968).

La mise en évidence des diverses activités deshydrogénasiques du cycle de Krebs a été souvent utilisée en pathologie myocardique. Au cours de l'ischémie, divers auteurs ont montré que l'activité succino-deshydrogénasique (SDH) disparaissait après un temps de latence de 4 à 6 heures (Kaufman *et al.*, 1959; Hecht, Korb et David, 1961; Shnitka et Nachlas, 1963; Bajusz et Jasmin, 1964; Hecht, 1964; Fine et Morales, 1966). Avec les sels de tetrazolium (NitroBT) comme accepteurs d'électrons, les altérations observées concernent non seulement l'intensité de la réaction colorée, mais la distribution des sites d'activité marqués par les dépôts de formazan. La plupart accordent une signification à l'apparition de gros granules bleutés de 1 à 3  $\mu$  (Shnitka et Nachlas, 1963; Kakari, 1970). Cette activité granulaire G, bien différente de la distribution mitochondriale normale dite fibrillaire F (Niles, 1966) paraît liée aux altérations mitochondrielles et à l'apparition de fines gouttelettes lipidiques modifiant l'équilibre physicochimique du cytoplasme (Kakari, 1970). Elle a été reproduite *in vitro* et observée *in vivo* dans plusieurs cardiomyopathies induites par des substances médicamenteuses ou toxiques. L'aspect obtenu en zone de nécrose est tout à fait différent et représente vraisemblablement un artefact en rapport avec l'affinité non spécifique des sels de tetrazolium pour les protéines cellulaires dénaturées. Rappelons qu'à 48 heures, toute activité deshydrogénasique a disparu dans le territoire de l'infarctus.

La comparaison entre les activités phosphorylasique et succinodeshydrogénasique permet de définir très nettement, entre la zone de nécrose et le myocarde normal à distance, une zone intermédiaire marginale, caractérisée par une disparition de l'activité P-asique et une activité SDH granulaire G. L'évolution

des lésions au cours des 48 premières heures montre d'importants remodelages du profil enzymatique dans les territoires marginaux, avec réduction progressive de la zone P-ase négative et SDH granulaire, et extension de la zone de nécrose.

L'activité cytochrome-oxydasique est constamment diminuée au cours de l'ischémie, comme pour toutes les enzymes du métabolisme oxydatif. Certains la considèrent comme un indicateur très précoce de l'ischémie (Jääskeläinen, 1966), alors que d'autres ne la trouvent nettement diminuée qu'après un délai de 1 à 4 heures (Shnitka et Nachlas, 1963; Bajusz et Jasmin, 1964; Hecht, 1964; Fine et Morales, 1966; Seiferth, 1967). Dans notre matériel, la réaction enzymatique n'est nettement altérée qu'à 6 heures, avec une évolution comparable à celle de la SDH.

La glucose-6-phosphate deshydrogénase est un chainon important du shunt des hexoses monophosphates. Son activité est faible dans le myocarde normal dont le métabolisme est essentiellement tourné vers la production d'énergie. Son renforcement dans les zones périfocales, surtout à la phase tardive du processus, suggère une activation des processus de synthèse, notamment de la synthèse des nucléoprotéines (Dusek, 1971).

L'incidence de la revascularisation sur l'évolution des infarctus expérimentaux est encore mal connue. Depuis les premiers travaux de Blumgart, Gilligan et Schlesinger (1941), divers auteurs ont étudié les effets sur le myocarde d'une ischémie temporaire (Yabuki *et al.*, 1959; Fisher et Edwards, 1969; Sommers et Jennings, 1964; Hort et Dacanalis, 1965; Jennings, 1974). Certains ont souligné les particularités histopathologiques et ultrastructurales de ces infarctus revascularisés (Sommers et Jennings, 1964). On a insisté sur l'importance, dans ces cas, des suffusions hémorragiques qui peuvent jouer le rôle d'un facteur aggravant dans l'évolution des lésions (Breshnahan *et al.*, 1974). Les aspects morphologiques notés après revascularisation sont à rapprocher de certaines lésions observées chez l'homme, au cours du choc hémorragique (Martin et Hackel, 1963). Il n'est pas interdit de penser que les troubles profonds de la perméabilité capillaire qui accompagnent l'anoxie jouent un rôle déterminant dans cette érythrodiapédèse.

En réalité, la question essentielle est de savoir dans quelle mesure la restauration précoce du flux sanguin dans un territoire ischémique est susceptible de réduire l'étendue de la nécrose tissulaire. Il est généralement admis que les altérations métaboliques prénécrotiques des cellules myocardiques passent par une phase de réversibilité, puis d'irréversibilité (Jennings, 1969). Au plan théorique, ce point d'irréversibilité peut être considéré comme dépassé quand les processus biochimiques qui président au métabolisme énergétique ne peuvent plus assurer l'intégrité structurale et fonctionnelle de la cellule. Pour la plupart des auteurs, ce stade d'irréversibilité est atteint après 20 à 60 minutes d'ischémie (Blumgart *et al.*, 1944; Jennings et Sommers, 1960; Krug, 1970; Brachfeld, 1974). Par contre, il paraît possible, chez le Chien, de restaurer les battements cardiaques après une période d'anoxie de 90 minutes (Coffman *et al.*, 1960). Krug, du Mesnil de Rochemont et Korb (1966) obtiennent, chez le Chat, en utilisant comme marqueur l'injection de substance fluorescente, des infarctus de taille réduite pour des durées de ligature coronaire inférieures à 90 minutes. Récemment, Maroko *et al.* (1972), Ginks *et al.* (1972—1974) ont montré, chez le Chien,

par des techniques morphologiques, électrocardiographiques et biochimiques, la possibilité de sauver de la nécrose du tissu myocardique par reperfusion coronaire après 3 heures d'ischémie. Pour notre part (Fontaliran *et al.*, 1972; Deloche *et al.*, 1972), la revascularisation réalisée dans les 12 premières heures, grâce à une technique originale de ligature amovible, nous a permis d'obtenir chez le Rat des infarctus d'étendue réduite dans près de 80%. Dans la série présente, répondant au même protocole chirurgical, le rétablissement du flux sanguin s'accompagne d'une réduction modérée ou importante de la taille de l'infarctus dans la moitié des cas pour une durée d'ischémie de 6 heures, et les deux tiers des cas pour une durée d'ischémie d'une heure. Aucun des infarctus levés à la 12ème heure n'a été modifié par rapport aux infarctus par ischémie permanente. Le petit nombre de cas étudiés dans chaque série ne permet guère de faire des comparaisons chiffrées, d'autant que les méthodes d'étude sont différentes. Le fait important est la possibilité, chez le Rat, d'obtenir par revascularisation au cours de 6 premières heures d'ischémie une réduction notable de la taille de l'infarctus.

Ainsi, avec des différences peut-être liées au protocole utilisé et tout particulièrement au choix de l'animal d'expérience, plusieurs travaux expérimentaux suggèrent que, même pour une ischémie de plus d'une heure, la restauration du flux sanguin peut favoriser la récupération structurale et fonctionnelle de certains territoires myocardiques. Ces constatations ne remettent pas en cause les critères biochimiques de viabilité de la cellule myocardique, mais le territoire myocardique privé d'irrigation sanguine n'est pas une masse tissulaire homogène. L'ischémie est un processus dynamique, progressif, soumis à de nombreux facteurs biochimiques et hémodynamiques. Au début, la zone dépendant de l'artère ligaturée est un mélange de foyers dégénératifs en voie de nécrose et de cellules myocardiques métaboliquement actives, notamment en périphérie. Après 45 minutes d'anoxie, on estime que 35 à 66% de la population cellulaire montre une activité métabolique de base compatible avec la survie, même si la fonction mécanique n'est pas assurée (McKeever *et al.*, 1958; Jennings *et al.*, 1963; Brachfeld, 1974). Nos observations histoenzymologiques confirment cette progressivité dans l'installation des lésions. Les 24 et même 48 premières heures sont marquées par des modifications importantes des différentes zones identifiées en fonction de leur profil enzymatique. Le rétablissement précoce du flux sanguin a pour effet de réduire en quelques heures la zone marginale P-ase négative et SDH granulaire. Cette réduction s'accompagne d'une stabilisation de la zone de nécrose. La restitution dans les zones marginales des activités P-asique et SDH normales est compatible avec ce qui a été observé dans d'autres cardio-myopathies expérimentales, après intoxication par le KCN par exemple (Hecht, 1967), et *in vitro* (Kakari, 1970), où l'on a pu montrer la réversibilité de ces altérations histoenzymologiques. Ces constatations corroborent les travaux de Lushnikov (1963), de Cox, McLaughlin, Flowers et Horan (1968), qui ont insisté, à partir de documents histoenzymologiques, sur le comportement des zones marginales au cours des phases précoces du processus. Il paraît probable que la récupération de certains territoires myocardiques se fasse à partir de ces zones, surtout marginales, qui n'ont pas été définitivement frappées dans leur métabolisme énergétique dès la première heure.

Une dernière question est soulevée par l'inégalité des résultats. Si la possibilité d'obtenir par revascularisation précoce une réduction de la taille de l'infarctus paraît acquise dans certains cas, il est incontestable que, dans bon nombre d'autres, le rétablissement même précoce du flux sanguin aboutit à des lésions de topographie superposable à celle des infarctus par ischémie permanente. Dans notre série, le tiers des levées de ligature après une heure d'ischémie comporte une telle évolution. Bien plus, l'étude histoenzymologique des premières phases du processus montre parfois une extension plus rapide de la zone de nécrose. Les vérifications coronographiques et histologiques effectuées permettent d'éliminer la persistance d'un obstacle au niveau de la ligature (thrombose par exemple). Certaines observations suggèrent l'intervention, dans ces cas, de perturbations profondes de la microcirculation. L'absence dans certains territoires ischémiques de réexpansion vasculaire à l'échelon capillaire, malgré la réinjection correcte du lit artériel après rétablissement du flux sanguin, serait susceptible d'aggraver l'anoxie tissulaire. Oedème cellulaire ou «sludge» pourraient être responsables de ce second obstacle, au niveau de la microcirculation. Dans ces zones, le processus évoluerait pour son propre compte et échapperait aux effets favorables de la revascularisation. Dès 1966, Krug *et al.* et, plus récemment, Hauschild, U. *et al.*, ont évoqué le rôle des facteurs microcirculatoires dans l'ischémie myocardique expérimentale. D'autres auteurs ont observé des faits semblables dans la surrenale (Kovacs *et al.*, 1966), l'encéphale (Kowada *et al.*, 1968; Ames *et al.*, 1968) et la peau (Willms-Kretschmer et Majno, 1969). L'étude de ces modifications par des techniques d'injections de masses opaques et colorées est actuellement en cours. Les résultats feront l'objet d'une publication ultérieure.

### Bibliographie

- Ames, A., Wright, R. W., Kowada, M., Thurston, J. M., Majno, G.: Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Amer. J. Path.* **52**, 437—454 (1968)
- Baghirzade, M. F., Kirsch, U., Hauschild, U.: Capillareinengung bei anoxisch und ischämisch bedingtem Ausstieg des Coronarwiderstandes im Meerschweinchenlurzen. *Virchows Arch. Abt. A* **351**, 193—204 (1970)
- Bajusz, E., Jasmin, G.: Comparative morphogenesis and enzyme histogenesis of some occlusive and metabolic cardiac necroses. *Rev. canad. Biol.* **22**, 181—199 (1963)
- Bajusz, E., Jasmin, G.: Histochemical studies on the myocardium following experimental interference with coronary circulation in the Rat. I. Occlusion of coronary artery. *Acta histochem. (Jena)* **18**, 222—237 (1964)
- Bajusz, E., Jasmin, G.: Histochemically demonstrable phosphorylase as an early index of anoxic myocardial damage. *Experientia (Basel)* **20**, 373 (1964)
- Blumgart, H. L., Gilligan, D. R., Schlesinger, M. J.: Experimental studies on the effect of temporary occlusion of coronary arteries. — II. The production of myocardial infarction. *Amer. Heart J.* **22**, 374—389 (1941)
- Brachfeld, N.: Maintenance of cell viability. *Circulation (Suppl.)* **39**, 40—202 (1969)
- Brachfeld, N.: Ischemic myocardial metabolism and cell necrosis. *Bull. N. Y. Acad. Med.* **50**, 261—293 (1974)
- Breshnahan, G. F., Roberts, R., Shell, W. E., Ross, J. Jr., Sobel, B. E.: deleterious effects of hemorrhage after myocardial reperfusion. *Am. J. Cardiol.* **32**, 82 (1974)
- Coffman, J. D., Lewis, F. B., Gregg, D. E.: Effect of prolonged periods of anoxia on atrioventricular conduction and cardiac muscle. *Circulat. Res.* **8**, 649 (1960)

- Cox, J. L., McLaughlin, V. W., Flowers, N. C., Horan, L. G.: The ischemic zone surrounding acute myocardial infarction. Its morphology as detected by deshydrogenase staining. *Amer. Heart J.* **76**, 650—659 (1968)
- Deloche, A., Fontaliran, F., Fabiani, J. N., Pennecot, G., Carpentier, A., Dubost, Ch.: Etude expérimentale de la revascularisation chirurgicale précoce de l'infarctus du myocarde. *Ann. Chir. Thor. Cardiovasc.* **11**, 89—105 (1972)
- Dobson, J. G., Mayer, J. E.: Mechanisms of activation of cardiac glycogen phosphorylase in ischemia and anoxia. *Circulat. Res.* **33**, 412—420 (1973)
- Dusek, J., Rona, G., Kahn, D. S.: Healing process in the marginal zone of an experimental myocardial infarct: finding in the surviving cardiac muscle cells. *Amer. J. Path.* **62**, 321—332 (1971)
- Fine, G., Morales, A., Scerpella, J. R.: Experimental myocardial infarction: a histochemical study. *Arch. Path.* **82**, 4—8 (1966)
- Fischer, S., Edwards, W. S.: Tissue necrosis after temporary coronary artery occlusion. *Amer. Surg.* **29**, 617—619 (1963)
- Fontaliran, F., Deloche, A., Camilleri, J. P., Carpentier, A., Diebold, J.: Effets de la revascularisation sur l'évolution histopathologique de l'infarctus expérimental du Rat. *Path. et Biol.* **20**, 393—400 (1972)
- Ginks, W., Ross, J., Sybers, H.: Prevential of gross myocardial infarction in the canine heart. *Arch. Path.* **97**, 380—384 (1974)
- Ginks, W. R., Sybers, H. D., Maroko, P. R., Covell, J. W., Sobel, B. E., Ross, J.: Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion. *J. clin. Invest.* **51**, 2717—2723 (1972)
- Hauschild, U., Baghizade, M.-F., Kirsch, U.: Capillarkompression als Ischämiefolge. Elektronenoptische Untersuchungen an Papillarmuskeln des Menschen und des Meerschweinchens. *Virchows Arch. Abt. A* **351**, 205—224 (1970)
- Hecht, A.: Fermenthistochemische Frühveränderungen beim experimentellen Herzinfarkt. *Virchows Arch. path. Anat.* **337**, 414—424 (1964)
- Hecht, A.: Fermenthistochemische Befunde am Granulationsgewebe des experimentellen Herzinfarktes. *Virchows Arch. path. Anat.* **338**, 5—15 (1964)
- Hecht, A.: Zum Problem der fermenthistochemischen Erfassung unterschiedlicher Schädigungsmechanismen am Rattenherzmuskel am Beispiel der Phosphorylaseaktivität. *Beitr. path. Anat.* **137**, 322—332 (1967)
- Hecht, A.: Enzyme histochemistry of Heart muscle in normal and pathologic conditions. *Meth. Achiev. exp. Path.* **5**, 384—436 (1971)
- Hecht, A., Jennrich, M., Friedrich, C.: Sauerstoffmangelzustände und histochemisch nachweisbare Phosphorylaseaktivität am Rattenherzmuskel. *Histochemistry* **14**, 335—342 (1968)
- Hecht, A., Korb, G., David, H.: Vergleichende histochemische, fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen zur Frühdiagnose des Herzinfarktes der Ratte. *Virchows Arch. path. Anat.* **334**, 267—284 (1961)
- Hort, W., Dacanal, J. P.: Untersuchungen an Rattenherzen nach temporärer Unterbindung der linken Kranzarterie. *Virchows Arch. path. Anat.* **339**, 61—71 (1965)
- Jääskeläinen, A. J.: Phosphorylase activity in myocardial infarction and its post mortem demonstrability in the Rat. *Ann. Med. exp. Fenn.* **44**, 541—543 (1966)
- Jennings, R. B.: Effects of a transient period of ischemia on myocardial cells. *Amer. J. Path.* **74**, 3, 381 (1974)
- Jennings, R. B., Kaltenbach, J. P., Sommers, H. M., Bahr, G. F., Wartman, W. R.: Studies of dying myocardial cell. In: *The etiology of myocardial infarction* (James, T. N. and Keyes, J. W., eds.), chap. 12. Boston: Brown 1963
- Jennings, R. B., Sommers, H. M., Herdson, P. B., Kaltenbach, J. P.: Ischemic injury of the myocardium. *Amer. N. Y. Acad. Sci.* **156**, 61—78 (1969)
- Johns, T. N. P., Olson, B. I.: Experimental myocardial infarction. I. Method of coronary occlusion in small animals. *Amer. J. Surg.* **140**, 675—682 (1954)
- Kakari, S.: Observation on the use of Nitroblue tetrazolium in the detection of early myocardial changes. *The histochem. J.* **2**, 453—477 (1970)
- Kaufman, N., Gavan, T. L., Hill, R. W.: Experimental myocardial infarction in the rat. *Arch. Path.* **67**, 482—488 (1959)

- Kent, S. P., Diseker, M.: Early myocardial ischemia: study of histochemical changes in dog. *Lab. Invest.* **4**, 398—405 (1955)
- Klionsky, B.: Myocardial ischemia and early infarction: a histochemical study. *Amer. J. Path.* **36**, 575—591 (1960)
- Korb, G.: Morphologische Untersuchungen an experimentellen Herzmuskelnekrosen. *Habilitationsschrift. Marburg*, 1964
- Korb, G., Totovic, V.: Electromicroscopical studies on experimental ischemic lesions of the heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **156**, 48—60 (1969)
- Kovacs, K., Carroll, R., Tapp, E.: Temporary ischaemia of the adrenal gland. *J. Path. Bact.* **91**, 235—240 (1966)
- Kowada, M., Ames, A., Majno, G., Weight, R. L.: Cerebral ischemia. An improved experimental method for study; cardiovascular effects and demonstration of an early vascular lesion in the rabbit. *J. Neurosurg.* **28**, 150—157 (1968)
- Krug, A.: The extent of ischemic damage in the myocardium of the cat after permanent and temporary coronary occlusion. *J. thorac. cardiovasc. Surg.* **60**, 242—247 (1970)
- Krug, A., Dharamadhach, A., Krug, Ch.: Zum histochemischen Phosphorylasennachweis im Herzinfarkt. *Histochemie* **10**, 376—377 (1967)
- Krug, A., Korb, G.: Durchblutungsstörungen und Histologische sowie enzymhistochemische Frühveränderungen am Katzenherzen nach temporärer Unterbindung von Koronar-gefäßen. *Beitr. path. Anat.* **134**, 29—51 (1966)
- Krug, A., Rochamont, W. de, Korb, G.: Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circulat. Res.* **19**, 57—62 (1966)
- Lie, J. T., Holley, K. T., Kampa, W. R., Titus, J. L.: New histochemical method for morphologic diagnosis of early stages of myocardial ischemia. *Proc. Mayo Clin.* **46**, 319—327 (1971)
- Lushnikov, E. F.: Histochemical study of experimentally produced myocardial infarction. *Fed. Proc.* **22**, 906—910 (1963)
- McKeever, W. P., Gregg, D. E., Canney, P. C.: Oxygen uptake of the nonworking left ventricle. *Circulat. Res.* **6**, 612—616 (1958)
- McNamara, J. J., Smith, G. T., Svehiro, G. T., Soeter, J. R., Anema, R. J., Morgan, A. L., Liao, S. K.: Myocardial viability after transient ischemia in primates. *J. thorac. cardiovasc. Surg.* **68**, 248—256 (1974)
- Mallory, G. K., White, P. D., Salcedo-Salgar, J.: The speed of healing of myocardial infarction: a study of the pathological anatomy in seventy-two cases. *Amer. Heart J.* **18**, 647—671 (1939)
- Maroko, P. R., Kjekshus, J. K., Sobel, B. E., Watanabe, T., Covell, J. W., Ross, J., Braunwald, E.: Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation* **43**, 67—82 (1971)
- Maroko, P. R., Libby, P., Ginks, W. R., Bloor, C. M., Shell, W. E., Sobel, B. E., Ross, J.: Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *J. clin. Invest.* **51**, 2710—2716 (1972)
- Maroko, P. R., Libby, P., Sobel, B. E., Bloor, C. M., Sybers, H. D., Shell, W. E., Covell, T. W., Braunwald, E.: Effect of glucose-insulin-potassium infusion on myocardial infarction following experimental coronary artery occlusion. *Circulation* **45**, 1160—1175 (1972)
- Martin, A. M., Hackel, D. B.: The myocardium of the dog in hemorrhagic shock. A histochemical study. *Lab. Invest.* **12**, 77—91 (1963)
- Meijer, A. E. F. H.: Improved histochemical method for the demonstration of the activity of  $\alpha$ -glucan-phosphorylase. I. The use of glycosyl acceptor dextran. *Histochemie* **12**, 244—252 (1968)
- Niles, N. R., Bitensky, L., Braimbridge, M. V., Chayen, J.: Histochemical changes related to oxidation and phosphorylation in human heart muscle. *J. roy. mier. Soc.* **86**, 159—166 (1966)
- Niles, N. R., Bitensky, L., Chayen, J., Cunningham, G. T., Braimbridge, M. V.: The value of histochemistry in the analysis of myocardial dysfunction. *Lancet* **1964I**, 963—965
- Niles, N. R., Zavin, J. D., Morikado, R. N.: Histochemical study of effects of hypoxia and isoproterenol on rat myocardium. *Amer. J. Cardiol.* **22**, 381—388 (1968)

- Pearse, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. J. & A. Churchill Ltd. London: 1961
- Schulze, W., Krause, E. G., Wollenberger, A.: Über die unterschiedlichen Aussagen der histochemischen und quantitativ-biochemischen Bestimmung der Phosphorylaseaktivität im Herzmuskel nach Koronararterienverschluß und nach künstlich erzeugtem Glykogenmangel. *Acta histochem. (Jena)* **32**, 270—280 (1969)
- Seiferth, J.: Fermenthistochemische Frühveränderungen des experimentellen Myokardinfarkts bei der Ratte. *Frankfurt. Z. Path.* **76**, 329—339 (1967)
- Seiferth, J.: Histochemische Untersuchungen zum Glykogenabbau im experimentellen Myokardinfarkt bei der Ratte. *Acta histochem. (Jena)* **26**, 351—359 (1967)
- Selye, H., Bajusz, E., Graslo, S., Mendell, P.: Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* **11**, 398—407 (1960)
- Shnitka, T. K., Nachlas, M. M.: Histochemical alterations in ischemic heart muscle and early myocardial infarction. *Amer. J. Path.* **42**, 507—527 (1963)
- Sommers, H. M., Jennings, R. B.: Experimental acute myocardial infarction. Histologic and histochemical studies of early myocardial infarcts induced by temporary or permanent occlusion of a coronary artery. *Lab. Invest.* **13**, 1491—1503 (1964)
- Wartman, W. B., Jennings, R. B., Yokoyama, H. D., Clabaugh, G. F.: Fatty change of the myocardium in early experimental infarction. *Arch. Path.* **62**, 318—323 (1956)
- Willerson, J. T., Powell, W. P., Guiney, T. E., Stark, J. J., Sanders, C. A., Leaf, A.: Improvement in myocardial function and coronary blood flow in ischaemic myocardium after mannitol. *J. clin. Invest.* **51**, 2989 (1972)
- Willms-Kretschmer, K., Majno, G.: Ischemia of the skin. Electron microscopic study of vascular injury. *Amer. J. Path.* **54**, 327—353 (1969)
- Yabuki, S., Blanco, G., Imbriglia, J. E., Bentivoglia, L., Bailey, C. P.: Time studies of acute, reversible coronary occlusion in dogs. *J. thorac. Surg.* **38**, 40—45 (1959)
- Yokoyama, H. O., Jennings, R. B., Clabaugh, G. F., Wartman, W. B.: Histochemical studies of early experimental myocardial infarction. Periodic acid-Schiff method. *Arch. Path.* **59**, 347—354 (1955)

Dr. J. P. Camilleri  
Laboratoire d'Anatomie Pathologique  
U.E.R. Broussais, Hôtel-Dieu  
21, Rue École de Médecine  
F-75006 Paris, France