

Modifications précoces, histoenzymologiques et ultrastructurales, de l'aorte chez le lapin après injections d'adrénaline-thyroxine et régime hyperlipidique

G. Chomette, M. Auriol, J. Brohon et J. Sterne

Département d'Anatomie Pathologique, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière (Paris)
et Département de Recherche de la S.N.E.L.A. (Suresnes)

Reçu le 21 juillet 1975

Early Histoenzymologic and Ultrastructural Changes Induced by Adrenalin-Thyroxine and Fat Diet in Rabbit Aorta

Summary. The first stages of the atherosclerotic lesions induced in the rabbit aorta by adrenalin- thyroxine, with (or without) an hypercholesterolic diet, have been studied on the 6th, 13th, and 22nd day. Major parietal changes, barely demonstrable with light microscopic standard techniques, were detected, as soon as the 6th day, by electronmicroscopy and histoenzymology. These changes were probably due solely to the hormonal treatment. In the early stage, they consisted of some fragmentations of the elastic sheets and some smooth muscle cell lysis. The oxidative and ATPase activities were greatly reduced. The increased lysosomal hydrolase activities of the outer layers of the vessel could be related to the increased vascular permeability and consecutive increased perfusion gradient induced by these lesions. Later, an obvious repair process was seen. The smooth muscle cells bearing numerous processes were bound by many microfilaments and by some elastic material. The energetic enzymatic activities were increased.

The part taken by the lipidic diet in these changes, apart from the increase of the esterase activity, did not seem yet of significance in this first stage of atherosclerosis. However, one cannot exclude that the intensively accumulating lipids might, at some later stages, potentiate the consequences of the vascular lesions or impede the repair process.

Parmi les multiples méthodes expérimentales utilisées jusqu'ici dans diverses espèces animales pour provoquer une athérosclérose vasculaire, la plupart ne parviennent qu'après un long délai à la réalisation de lésions caractérisées. Il en est ainsi chez le lapin, qu'il s'agisse de régimes hypercholestérolémiques (Lenegre *et al.*, 1963; Knieriem, 1970) ou de diverses techniques d'attrition pariéto-vasculaire (immunisation: Robert *et al.*, 1971; lathyrisme: Bouissou *et al.*, 1973; irritation traumatique: Bjorkerund, 1969; Webster *et al.*, 1974).

Parmi ces divers procédés, celui préconisé autrefois par Josue (1903) (injection d'adrénaline), utilisé depuis par divers auteurs (Fischer, 1905; Kaiserling, 1907; Fischer-Wasels and Jaffe, 1926; Helin, 1970), puis modifié par Constantinides *et al.* (1958) (administration d'adrénaline-thyroxine) aboutit par la destruction des fibres musculaires médiales à la constitution de lésions pariéto-vasculaires nécrosantes d'une rare intensité.

L'adjonction dans un tel modèle expérimental d'un régime hyperlipidique renforce encore cette action, engendrant une athérosclérose précoce (Constantinides *et al.*, 1958; Fontaine *et al.*, 1965; Giordano *et al.*, 1970). Dans une série expérimentale importante, nous constatons nous-mêmes (Brohon *et al.*, 1974),

sous l'effet de 5 jours de traitement hormonal et de 2 semaines de régime hyperlipidique, des lésions vasculaires chez 76% des animaux étudiés. Celles-ci se caractérisaient, comme dans les expériences initiales de Constantinides *et al.* (1958) par des plages médiales nécrotiques et calcifiées, souvent décelables dès l'examen macroscopique de l'aorte. A ce stade précoce, l'« imprégnation » lipidique demeure généralement modeste, limitée à l'endothélium; elle ne suscite aucune réaction intimale proliférative. Certaines plages nécrotiques sont néanmoins abondamment chargées de lipides soudanophiles.

En utilisant cette même technique, et grâce à des méthodes d'appréciation morphologique plus fine, il nous a paru intéressant d'examiner les tout premiers stades de ces lésions pariéto-vasculaires nécrosantes.

Matériel et méthodes d'étude

Notre étude a porté sur 18 lapins de l'espèce « Fauve de Bourgogne », pesant 2,5 à 3 kilos. Nous avons utilisé exclusivement des animaux femelles, les résultats y étant, en effet, plus constants. 4 d'entre eux ont été utilisés comme témoins. 14 animaux ont été soumis pendant 5 jours à une administration par voie intra-péritonéale de thyroxine (50 µg par kilo d'une solution à 40 µg/ml) et à une perfusion intra-veineuse d'adrénaline à raison respectivement chaque jour de 25, 25, 50, 50 et 75 µg par kilo de poids d'une solution à 20 µg/ml. Après ces 5 jours de traitement, les animaux, non sacrifiés, étaient nourris avec un régime hyperlipidique comportant, dans sa ration habituelle, 1 gr. de cholestérol et 2 g de graisse de porc (substance riche en acides gras à longue chaîne), ceci durant une période variant de 7 jours à 2 semaines. L'efficacité de ce régime a été contrôlée par l'étude du taux des lipides sanguins totaux et du cholestérol qui, chez ces animaux, excédaient respectivement 8 g et 4 g/litre (taux chez les témoins respectivement inférieurs à 4 g et 1 g 20/l).

Par ailleurs, dans le but d'étudier l'effet préventif de la metformin (Agid and Marquie, 1969) — N. N. Diméthylguanide — sur ces lésions, un lot de 4 animaux a subi une semaine auparavant une injection journalière de 250 mg/kilo de ce produit et, durant le traitement hormonal, une administration également parentérale de 100 mg/kilo.

Ainsi, notre matériel expérimental comprenait:

4 lapins témoins.

6 animaux sacrifiés au 6ème jour après traitement hormonal simple (dont 2 avec administration conjointe de Metformin).

6 animaux sacrifiés au 13ème jour après traitement hormonal et régime lipidique (dont 2 après même essai de traitement préventif par Metformin).

2 animaux sacrifiés au 22ème jour après traitement hormonal et 2 semaines de régime hyperlipidique.

Après sacrifice par anesthésie au carbamate d'éthyl et saignée, l'importance des lésions aortiques était appréciée selon les gradients précédemment définis (Brohon *et al.*, 1974) et les prélèvements ont été effectués en zone pathologique et systématiquement sur l'aorte thoracique à 2 cm en-dessous de la crosse. L'étude en microscopie optique fut réalisée:

Sur prélèvements fixés au Bouin et inclus en paraffine. Des colorations appropriées sont pratiquées pour l'étude morphologique de routine (hématoxyne-éosine), la mise en évidence des fibres élastiques (Orceïne-Verhoeff) et des substances fondamentales (P.A.S., Bleu Alcian Bleu de Toluidine), la recherche du calcium (coloration de Von Kossa), l'appréciation de la richesse en acide ribonucléique (test de Brachet).

Sur prélèvements fixés au formol tamponné (Baker), où sont effectuées la recherche des graisses et l'identification par les méthodes appropriées de leurs diverses variétés (coloration de Schulz-Lieberman, à la digitonine, réaction plasmale, coloration de Luxol-Fast-Blue).

L'étude histo-enzymologique est réalisée après immersion des fragments aortiques dans l'Azote liquide (10 secondes) et coupe au cryotome type Harris. Différentes activités (ferments respiratoires, enzymes énergétiques, hydrolases acides) ont pu être appréciées (méthodes selon Pearse 1968, 1972):

Parmi les enzymes oxydatifs, dans les cycles glycolytiques aerobie et anaerobie le shunt des pentoses et le cycle de Krebs:

— la glucose 6 phosphate DH et la 6 phosphogluconate DH;

— la lactate dehydrogenase;

— l'isocitrate et la malate DH.

Les diaphorases: NADH2 et NADPH2, Tetrazolium reductase (Adams, 1967)

Les ATPases à pH 8,5 et 9,4 et la 5-nucleotidase.

Les hydrolases et enzymes cataboliques: phosphatases alcalines, P. acides, esterases non specifiques à la beta-naphtyl-acetate, Beta-glycuronidase, Leucyl-aminopeptidase acetylthiocholinestérase, Mono-Amino-Oxydase.

L'étude en microscopie électronique a été aussi réalisée: prélèvements fixés en Glutaraldehyde et post-fixés dans l'acide osmique. Inclusion en Epon après deshydratation dans des alcools à concentration croissante. Coupe à l'ultramicrotome L.K.B. — Coupes sémi-fines colorées au Bleu de Toluidine — Coupes fines contrastées par l'acétate d'uranyl et le citrate de Plomb — Examen au microscope électronique Hitachi HU 8 —

Résultats

Etude macroscopique et histologique

Sur les 14 animaux examinés, seuls deux d'entre eux, sacrifiés respectivement aux 13ème et 22ème jours, présentaient macroscopiquement des lésions significatives. Celles-ci, cantonnées à l'aorte thoracique, consistaient en rares plages blanchâtres, à peine surélevées, de 2 à 3 mm de diamètre (grade+) (Brohon *et al.*, 1974). Les 12 autres ne révélaient aucune modification patente. Toutefois il était possible, dans la plupart des cas, de noter une minceur et une flaccidité anormales de la paroi vasculaire.

En histologie conventionnelle, les deux aortes macroscopiquement anormales comportaient des zones nécrotiques situées dans la moitié interne de la média (Fig. 1a). De prime abord aucune modification patente n'était constatée chez les autres. Toutefois, certaines colorations, notamment celles des fibres élastiques, des muco-polysaccharides et des acides ribonucléiques, de même que celle des coupes sémi-fines, laissaient entrevoir chez la plupart des animaux dans les régions les plus internes de la paroi, au contact de la lumière, d'importants désordres (Fig. 1b):

Dédoulement de la limitante élastique interne et présence dans l'intima de quelques cellules allongées «myoïdes».

Rectitude anormale et fine fragmentation des lames élastiques les plus internes.

Distension ou affaissement des espaces inter-lamellaires et «dilution» de leur contenu alcianophile.

Anomalies morphologiques de myocytes, globuleux, perpendiculaires à la lumière et dans quelques cas, test de Brachet, particulièrement riche en A.R.N.

Par ailleurs, chez les animaux soumis à un régime hypercholestérolémique, les colorations appropriées n'objectivent qu'une faible quantité de graisse dans l'endothélium et la média. Toutefois, les lipides étaient présents en grande abondance dans les plages nécrotiques.

Etude histo-enzymologique

I. Les investigations pratiquées sur les 4 animaux témoins permettaient des constatations superposables dans l'ensemble à celles des autres auteurs (Adams, 1967; Brundel, 1972; Mitschek, 1975):

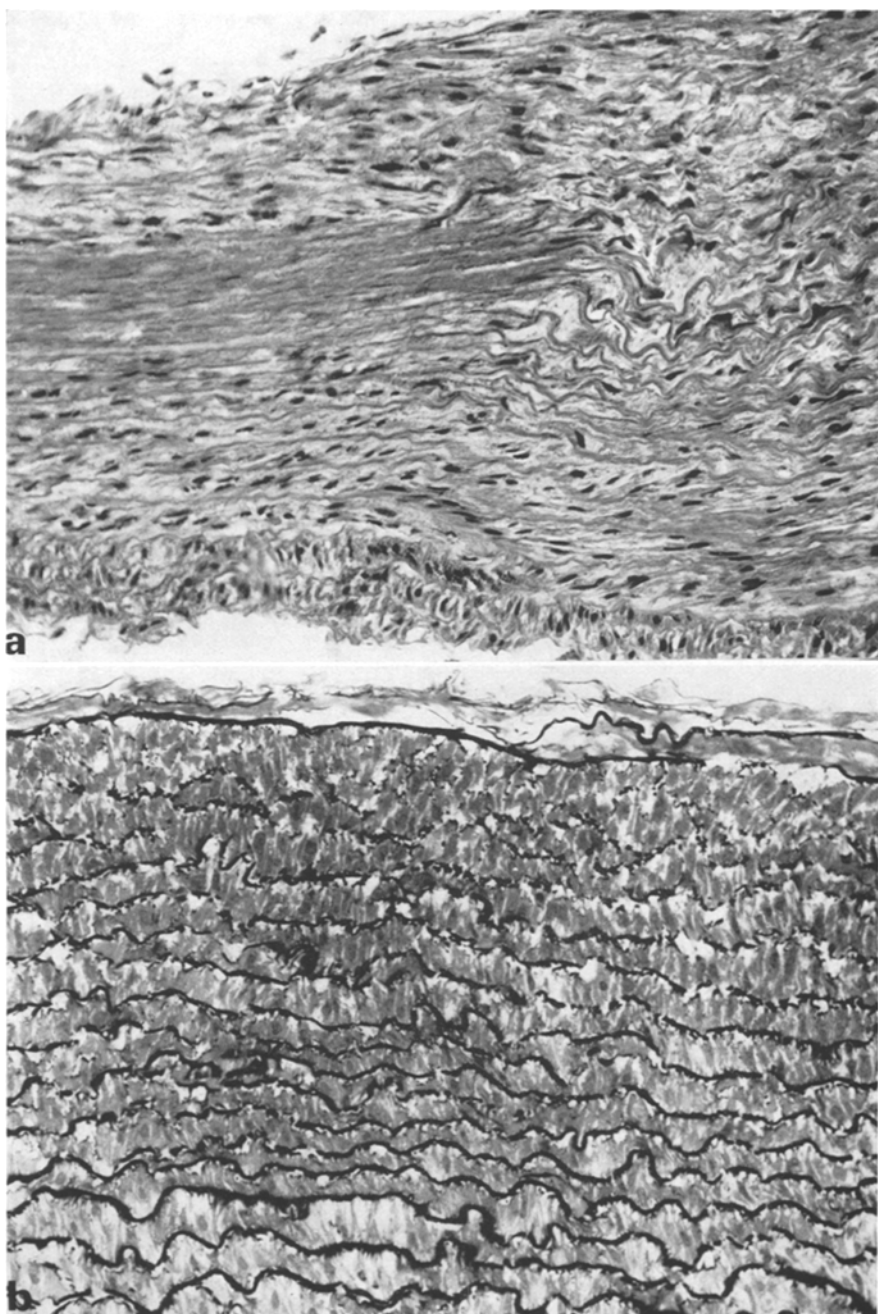


Fig. 1a et b. Histologie. (a) Nécrose de la média interne. Lapin sacrifié au 13^{ème} jour. H.E. G 300 \times . (b) Fragmentation des lames élastiques et anomalies des myocytes (perpendiculaires à la lumière). Lapin sacrifié au 13^{ème} jour. Bleu de Toluidine. G 450 \times

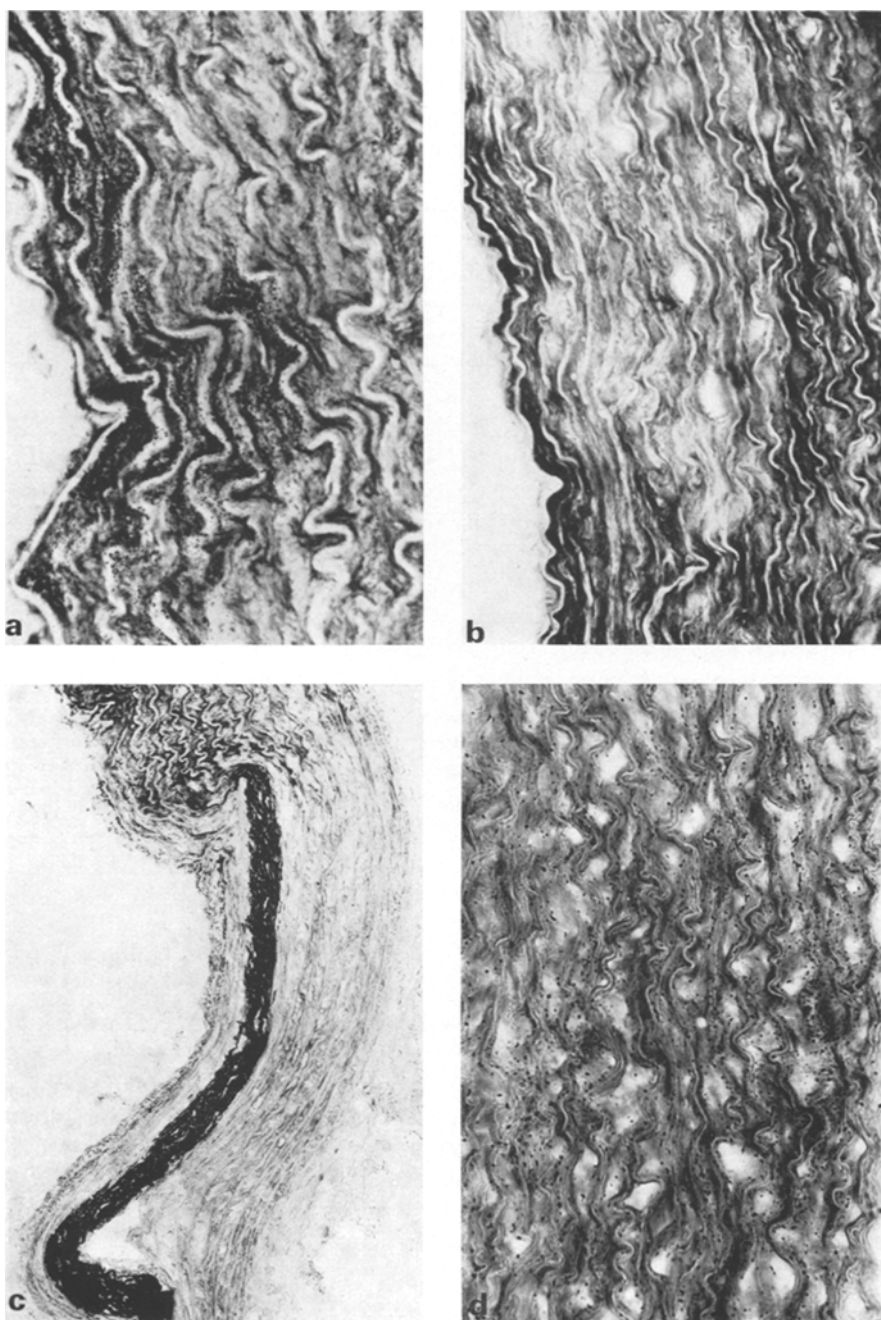


Fig. 2a—d. Histoenzymologie. (a) LDH. Négativité d'ensemble de la média, plage sous-intimale d'activité ++. Lapin sacrifié au 13^{ème} jour. G 675 \times . (b) ATPase à Ph 9,4. Zone inactive médiale. Lapin sacrifié au 13^{ème} jour. G 340 \times . (c) ATPase à Ph 9,4. Inactivité de la média, mais activité +++ sur une plage nécrotique. Lapin sacrifié au 13^{ème} jour. G 150 \times . (d) N. estérase. Activité importante (+++) dans la media (nombreuses granulations). Lapin sacrifié au 13^{ème} jour. G 150 \times

Les activités respiratoires et glycolytiques sont d'intensité différente selon les enzymes étudiées (+ pour la G6 PD et faiblement \pm pour le 6 PGD, + et ++ pour la MD et ICD, forte pour la LD +++). Elles témoignent d'autre part de deux gradients d'activité maxima, médiale interne et médio-adventicielle. Une activité diffuse de la LD affectant toute l'épaisseur de la média est toutefois observée chez 2 témoins.

Les diaphorases ont une activité diffuse et intense (+++) dans toute l'étendue de la média.

Les ATPases (à pH 8,5 et 9,4) attestent d'une forte activité diffuse dans la média (+++). Il en est de même pour la 5 nucleotidase (++++).

L'activité de la phosphatase alcaline est cantonnée à l'endothélium.

Les hydrolases acides (B. Glycuronidase, phosphatases acides) sont positives mais avec une faible intensité (+) dans la média externe et l'adventice. Il en est de même de la naphthol estérase (+), de l'acetyl thiocholinestérase et de la monoamino-oxydase (+).

Notons que, chez ces animaux adultes, dont la « maturation vasculaire » est terminée, la comparaison de ces différents tests au niveau de l'aorte abdominale et thoracique ne nous a pas révélé, comme chez les animaux jeunes, de différence significative (Hadjiisky *et al.*, 1970).

II. Chez la plupart des *animaux en expérience* (11 sur 14) d'importantes modifications sont observées. Quel que soit le lot expérimental elles apparaissent relativement uniformes, indépendantes de l'adjonction du régime hyperlipidique ou d'un essai de prévention par la Metformin.

Sur la totalité de la paroi vasculaire les activités des enzymes respiratoires et glycolytiques, de même que celles des diaphorases apparaissent considérablement diminuées. Les « gradients » internes (de la MD, ICD et G6 PD) disparaissent et la zone externe, elle-même, ne témoigne que d'une faible positivité \pm . L'activité de la LD se montre réduite chez presque tous les animaux à un fin « liseré » interne, intimo-sous-intimal, celle des diaphorases, normalement diffuse, se révèle à la fois moindre et hétérogène (alternance de zones + et de « lacunes » —). Toutefois, en contraste avec cette réduction générale s'observent chez quelques animaux de groupes à survie prolongée (Buck, 1962; Hadjiisky *et al.*, 1973) des îlots discontinus sous-intimaux d'activité importante (LD, MD, NAD +++ ou ++) (Fig. 2a).

L'activité générale des ATPases et de la 5 nucleotidase fléchit (+++ à ++). Des lacunes d'hypoactivité (\pm) de petites dimensions (aspect « spongieux ») et de larges zones inactives (—) (Fig. 2b) presque toujours à large base adventicielle apparaissent dans la média. Chez les animaux porteurs de plaques nécrotiques, l'activité de la média, très réduite, voire absente, contraste avec celles très intenses (+++), ATPasiques et cholinestérasiques (CHO-E) du secteur nécrosé (Fig. 2c).

Les hydrolases acides, les estérases, la monoaminoxidase, attestent de modifications moins patentes. Chez tous les animaux s'observe, néanmoins, un accroissement des estérases (++) (un peu plus fortes chez quelques animaux soumis au régime lipidique ++++) (Fig. 2d) et de la monoaminoxidase, des phosphatases acides et de la B. glycuronidase (B. glu) (++). Les granulations, plus nombreuses dans la média externe, tendent à gagner les couches moyennes,

voire à diffuser vers la tunique interne. Chez les animaux porteurs de plaques nécrotiques, d'autre part, l'activité hydrolasique (pH acides et beta-Glu) est plus particulièrement marquée au voisinage de celle-ci.

Au total, en utilisant le test le plus fiable d'attrition vasculaire, celui des activités ATPasiques, il apparaît possible de schématiser la gravité des modifications observées selon le gradient suivant (Tableau 1):

Groupe 0: absence de modification.

Group I: «lacunes ATPasiques» et activité respiratoire réduite.

Groupe II: zones de négativité ATPasique. Présence possible d'îlots d'importante activité oxydative sous-intimale.

Groupe III: baisse diffuse des ATPases, mais présence de plaques nécrotiques à activité ATPasique +++.

Par rapport à la durée de l'expérimentation, du 6ème au 22ème jour, ce gradient apparaît progressivement croissant chez les animaux étudiés (Tableau 2).

Tableau 1. Activité enzymologique chez les 18 animaux, témoins, soumis au traitement hormonal (adrénaline-thyroxine) et au traitement mixte (hormonal et régime hyperlipidique

	Témoins	Tt. Horm.	Tt. horm. + régime Chol.
ATP	+++	+++ L—	++ L— P+++
5 Nucl	++++	++ L—	++ L— P+++
6 PGD	+	—	—
MD	+	— à ± n ++	— à ± n ++
ICD	+	—	—
LD	+++	± n ++	± n ++
NAD	++	± n ++	± n ++
NADP	++	± n ++	± n ++
MAO	+	++	++
EST	+	++	++ à +++
CHOL. E	+	++	+++
B.GLU	+	+ à ++	+ à ++
P.Ac.	+	+ à ++	+ à ++
P.AL	+	+	+

Abbréviations: ± très faible activité, + faible activité, ++ activité moyenne, +++ activité forte, ++++ activité très forte. L = lacunes ou zones, P = plaque nécrotique, n = nodules sous — intimaux.

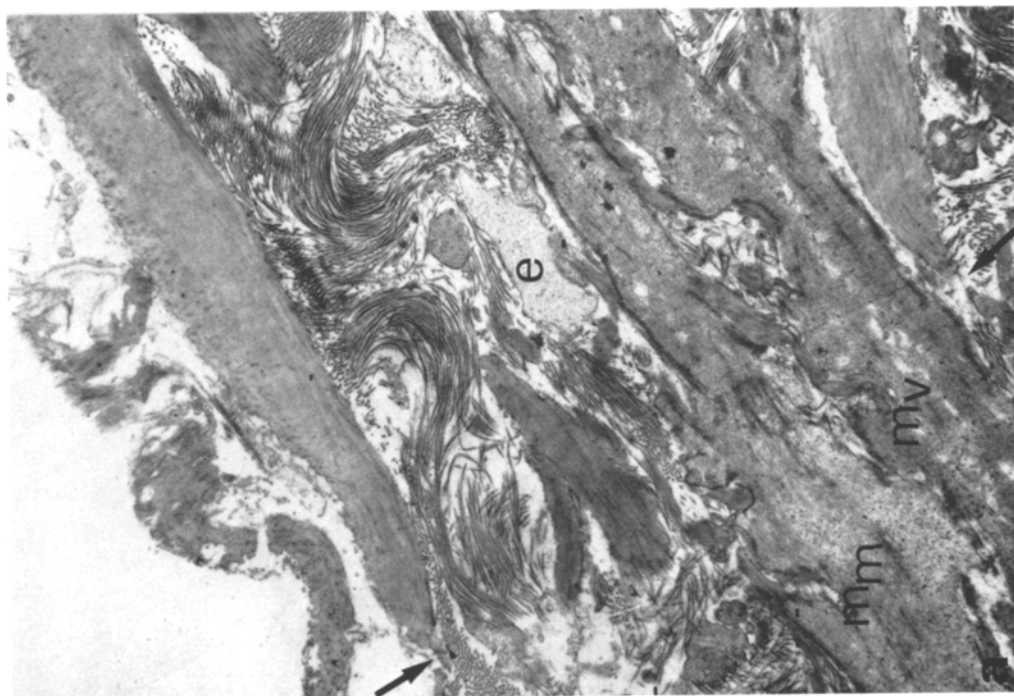
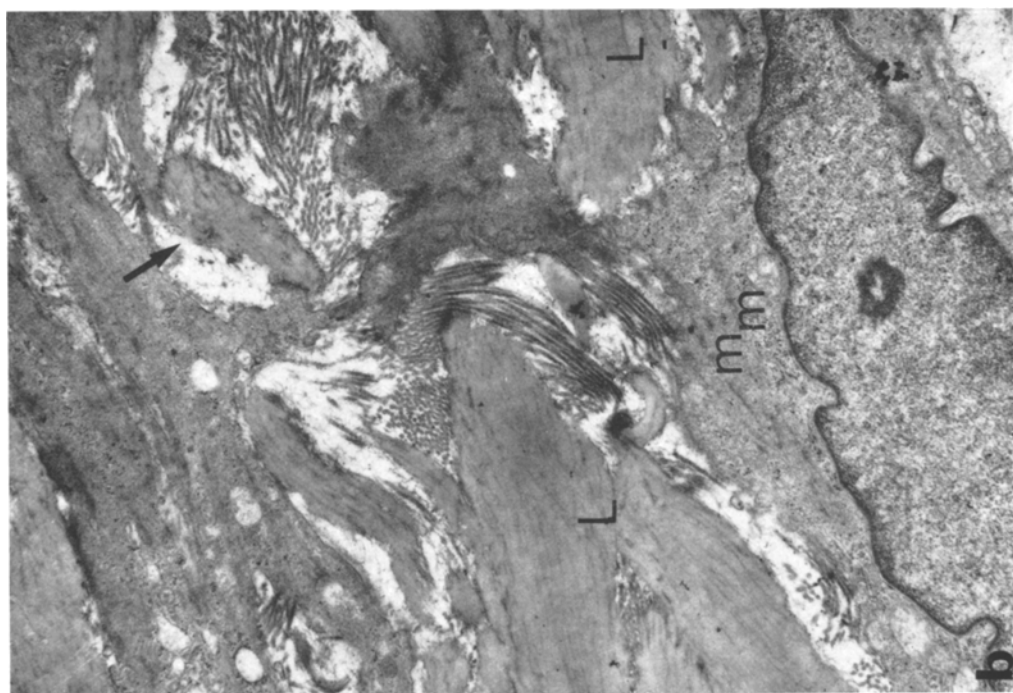


Fig. 3a, b

Tableau 2. Gradient lésionnel (0—I—II—III). Répartition numérique aux différents jours de l'expérimentation (6—13—22)

	0	I	II	III
6 j.	2	1	3	
13 j.	1		2	3
22 j.				2

Etude ultrastructurale

Etant donné l'absence de fixation *in situ*, l'endothélium de l'*intima* est en partie exfolié. Chez les animaux d'expérience les cellules, particulièrement actives, y sont pourvues de nombreuses expansions cytoplasmiques et de vésicules de pinocytose. L'espace sous-endothélial, clair, gonflé d'oedème (Fig. 3a) y contient quelques cellules allongées de nature musculaire, de rares fibres collagènes et quelques fines lamelles élastiques. Chez les animaux soumis au régime quelques particules lipidiques, fortement osmiophiles, sont visibles en outre dans les cellules endothéliales et les espaces interstitiels.

La couche externe de la *média*, chez les animaux d'expérience, fournit des images analogues à celles des animaux témoins. Les lames élastiques parallèles délimitent régulièrement entre elles des espaces peuplés de myocytes allongés, ovoïdes ou stellaires. Fortement contrastés, à limites sinueuses, pourvus d'un noyau riche en hétéro-chromatine, ceux-ci contiennent un matériel myofibrillaire abondant, strié de lignes de condensation longitudinales. Les organelles (mitochondries, appareil de Golgi, ergastoplasme) sont concentrées autour du noyau. Par ailleurs, s'observent au contact de la membrane plasmique les zones de condensation granuleuse habituelles ainsi que les vésicules d'endocytose régulièrement juxtaposées; une membrane basale continue, fine, granulo-filamenteuse, circonscrit ces éléments. Grâce à de multiples prolongements ces cellules contractent d'intimes connexions avec les dispositifs élastiques: jonction desmosomale, ancrage plus étendu, fuseau effilé inséré au sein même des lamelles. Entre cellules et lames élastiques les espaces interstitiels contiennent des fibres collagènes matures et des plages très claires, mal délimitées, régulièrement ponctuées de grains très fins. Les lamelles élastiques et les nodules ou amas inter-lamellaires comportent dans leur épaisseur de fines granulations ou des filaments minces et longitudinaux.

Des lésions affectant les *couches profondes* de la *média* sont constatées chez la plupart des animaux d'expérience (3 seulement dont les tests enzymologiques étaient d'ailleurs subnormaux ne présentaient pas d'anomalies importantes).

Fig. 3a et b. Ultrastructure — aspect général. (a) Oedème intimal important. Rupture de la limitante élastique interne (†) et de la 1ère lame élastique (†). Myocytes l'un vacuolisé (*mv*), l'autre partiellement modifié (*mm*), avec ribosomes ++. Expansions cytoplasmiques (*e*) et fibrillogénèse collagène importante. Lapin sacrifié au 13ème jour. G 4800×. (b) Rupture d'une lame élastique (*l*) avec petit séquestre (†). Myocyte modifié au contact (*mm*). Lapin sacrifié au 7ème jour. G 12000×

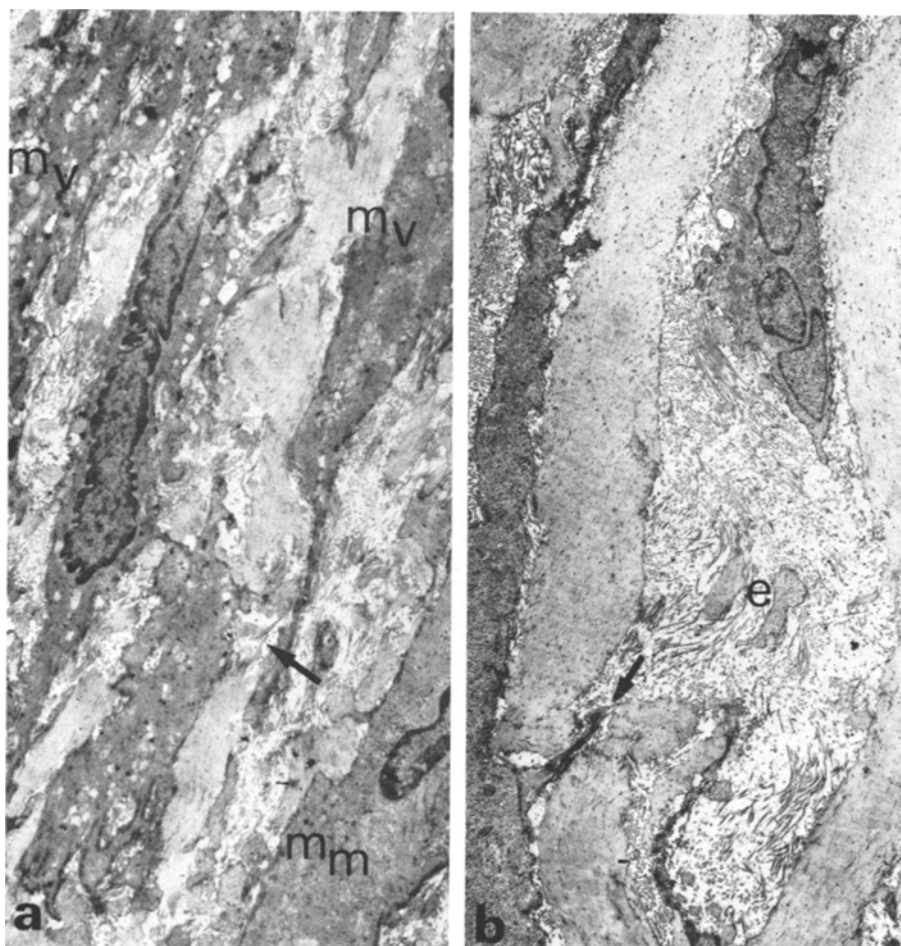


Fig. 4a et b. Ultrastructure — aspect général. (a) Media. Lésion importante: rupture des lames élastiques (↑). Polymorphisme cellulaire dans les espaces avec cellules vacuolisées (*mv*) et myocytes modifiés (*mm*). Lapin sacrifié au 13^{ème} jour. G 3200 ×. (b) Media — lésions parcellaires. Dépopulation claire localisée. Fibres collagènes et expansions cellulaires (*e*) au contact d'une fracture de lame élastique (↑). Lapin sacrifié au 22^{ème} jour. G 3200 ×

Aux faibles grossissements, dans les cas les plus sévères, la continuité et le parallélisme des dispositifs élastiques sont rompus. De larges brèches transversales délimitées par des lamelles grignotées, effilochées et fragmentées livrent passage à de gros myocytes globuleux et à des trousseaux collagènes (Fig. 3b). D'autre part, dans les espaces, abondent les *éléments* musculaires, se singularisant par la *diversité* de leur forme, de leur volume et de leur densité cytoplasmique (Fig. 4a). Dans les cas de moindre gravité les lésions, plus parcellaires, sont réduites à quelques fractures élastiques, à de rares secteurs de polymorphisme cellulaire ou même à des micro-foyers de dépopulation (Fig. 4b) habités seulement de fibres collagènes et de prolongements cellulaires globuleux.

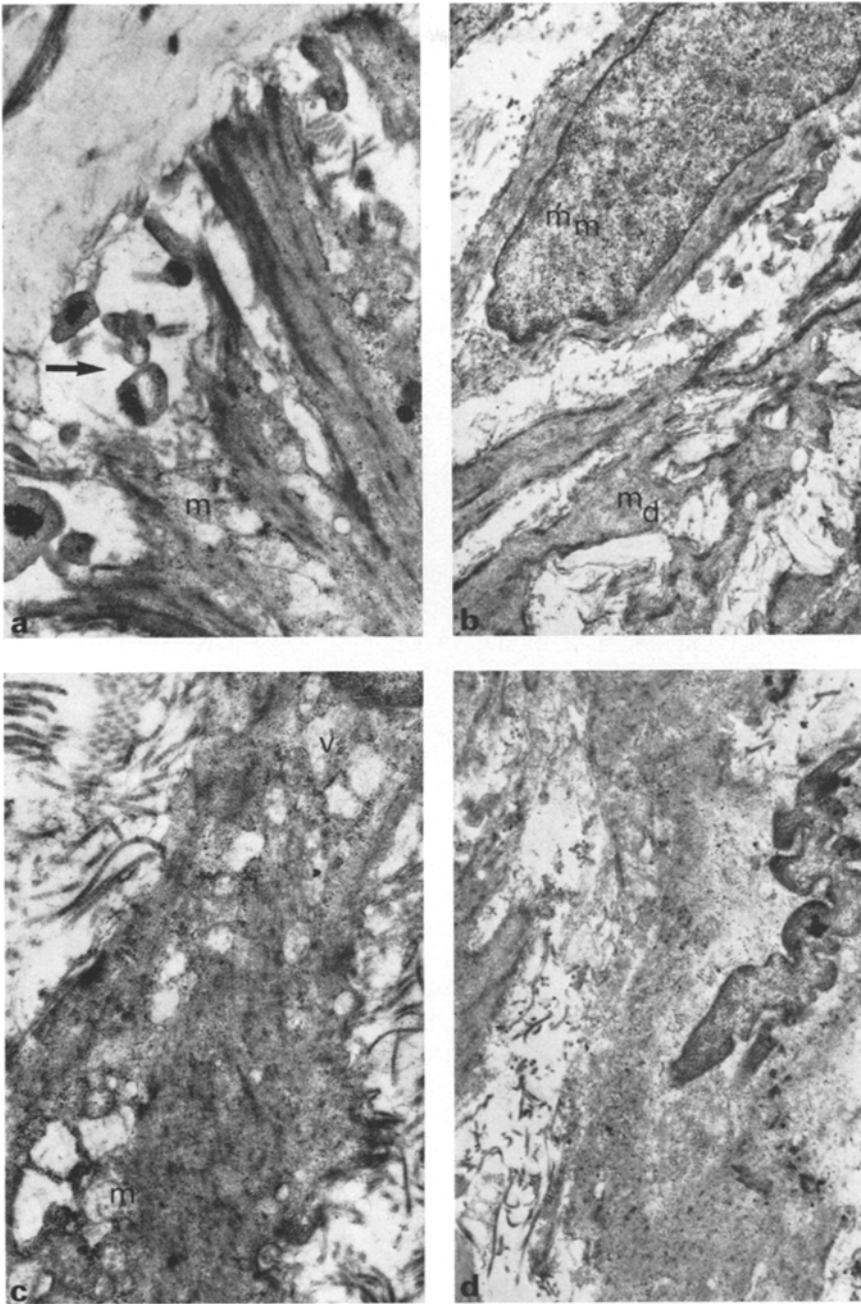


Fig. 5a—d. Myocytes. Lésions dégénératives. (a) Fuseaux desinsérés d'une lame élastique et partiellement retracts (\uparrow). Mitochondries vacuolaires (m) dans le corps cellulaire. Lapin sacrifié au 7^{ème} jour. G 12000 \times . (b) Myocyte en dégénérescence (md), retracts. Condensation marginale du matériel myofibrillaire. A son contact, myocyte modifié (mm). Lapin sacrifié au 7^{ème} jour. G 6800 \times . (c) Myocyte nécrosé. Distension vacuolaire de l'ergastoplasme (v). Lyse des crêtes des mitochondries (m). Lapin sacrifié au 7^{ème} jour. G 9000 \times . (d) Myocyte nécrosé. Oedème cytoplasmique et noyau contourné en voie de lyse. Lapin sacrifié au 7^{ème} jour. G 6800 \times

Une analyse à plus haute résolution décèle, *au sein des myocytes*, des modifications de signification diverse :

I. Beaucoup d'entre eux attestent d'une souffrance et d'une dégénérescence caractérisées. Dans les modifications les moins intenses, ils apparaissent sombres. Leurs contours, très sinueux, laissent voir de fréquentes désinsertions (Fig. 5a) : zone desmosomale rétractée, fuseau rompu dont les amarres nécrosées apparaissent, dans les lames élastiques, homogènes et fortement osmiophiles. Les trousseaux myofibrillaires sont marginés, concentrés en périphérie du cytoplasme (Fig. 5b). Dans la zone claire périnucléaire plus étendue apparaissent des citernes ergastoplasmiques dilatées, des mitochondries tuméfiées et vacuolaires. Au contact de la membrane plasmique les vésicules d'endocytose sont irrégulièrement réparties et la continuité de la membrane basale est interrompue par une multitude de déhiscences. La déchéance cellulaire plus complète, observée chez les animaux à survie plus longue (12e et 23e jours) s'exprime par des images de nécrose cellulaire franche :

Myocytes très *rétractés*, à contours diverticulaires dont le cytoplasme est vacuolaire (Fig. 5c). Les altérations nucléaires y sont patentes (forte indentation de la membrane et margination de la chromatine). Dans les mitochondries fortement tuméfiées la cristolyse est presque totale. Le matériel contractile homogénéisé se condense dans la cellule ou près de la membrane plasmique, en bandes opaques longitudinales.

Myocytes *nécrosés*, vacuolisés et oedémateux à noyau « frippé » ou même convertis totalement en masses granuleuses (Fig. 5d).

II. En contraste morphologique avec ces éléments et à leur voisinage s'observent, dans les espaces, de gros myocytes « modifiés » :

Certains d'entre eux sont *proches* à vrai dire des *myocytes en souffrance* : même margination de l'appareil contractile, mêmes modifications de la membrane plasmique et de la lame basale voisine. Cependant des zones de clarification cytoplasmique (Fig. 3a) laissent voir des polysomes et de larges citernes d'un ergastoplasme granulaire et une multitude de vésicules golgiennes apparaissent en périphérie ou, plus volontiers, dans la région périnucléaire (Fig. 6a). Le glycogène dans ces cellules, habituellement abondant, contraste avec le petit nombre des mitochondries.

D'autres éléments, *très simplifiés*, presque dépourvus de matériel contractile frappent par leur immaturité (Fig. 6b). Le noyau, souvent multiple, est pourvu d'un ou plusieurs nucléoles proéminents et « actifs », le cytoplasme parsemé d'un nombre considérable de polysomes contient de fines vésicules golgiennes à contenu

Fig. 6a—c. Myocytes modifiés. (a) Myocytes modifiés. Persistance, en peripherie, de l'appareil contractile (c). Grandes zones perinucléaires avec nombreuses vésicules golgiennes (g) et citernes ergastoplasmiques (er). Très nombreuses vésicules d'endocytose (†). Lapin sacrifié au 7^{ème} jour. G 6800×. (b) Myocytes modifiés simplifiés au contact de lames élastiques rompues. Raréfaction des organelles, mais nombreux ribosomes et polysomes. Nombreuses expansions péricellulaires (e). Lapin sacrifié au 13^{ème} jour. G 6800×. (c) Myocyte modifié avec raréfaction du matériel contractile et ribosomes. Multiples expansions (e) avec quelques pédicules (†) sur le corps cellulaire. Lapin sacrifié au 13^{ème} jour. G 12000×

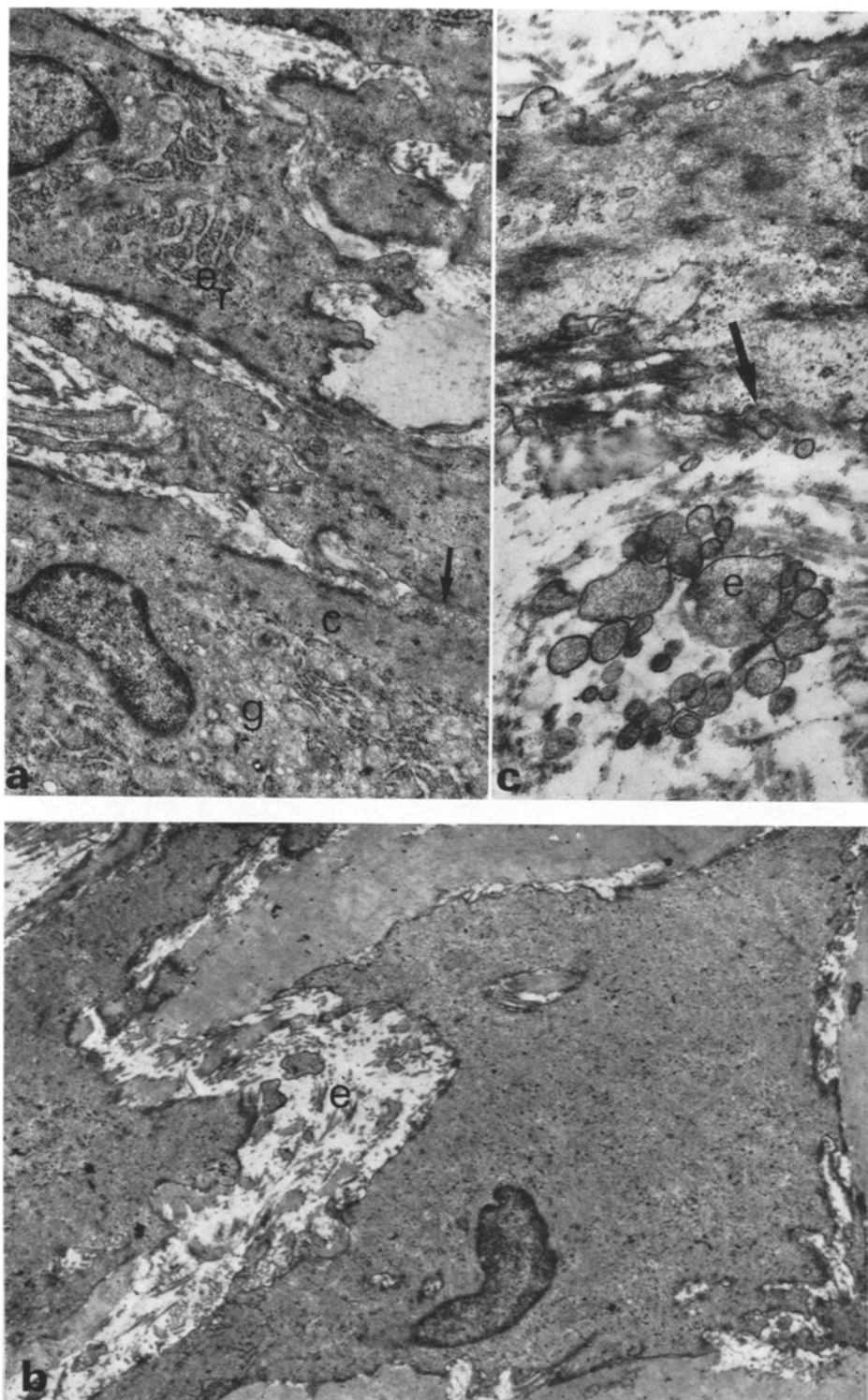


Fig. 6 a--c

sécrétoire. Les vacuoles d'endocytose, clairsemées mais volumineuses, déversent dans les espaces péri-cellulaires, une abondante sécrétion. La membrane basale trouée de larges discontinuités, se montre par endroits fortement épaissie et dédoublée.

Au contact de tous ces myocytes modifiés abondent les *expansions diverticulaires* dont les incidences privilégiées révèlent les connexions avec le corps cellulaire (Fig. 6c). Ce sont des formations de taille variable, à bordure arrondie ou un peu anguleuse (Fig. 7a), délimitées par une unit-membrane mais souvent dépourvues de lame basale. Les unes, de petite taille, sombres, émanent de cellules en souffrance. Les autres, volumineuses, souvent juxtaposées, renferment dans un hyaloplasme clair de nombreux ribosomes et de fines vésicules (Fig. 7b). Dans quelques prolongements s'observent des vacuoles plus importantes et des déhiscences, vers les espaces inter-cellulaires, de la membrane plasmique. Outre ces organites, quelques diverticules contiennent des mitochondries, de volumineuses vacuoles osmiophiles de nature lysosomiale. De plus (notamment chez les animaux soumis à la metformin) quelques formations sont abondamment chargées de grains de glycogène (Fig. 7c).

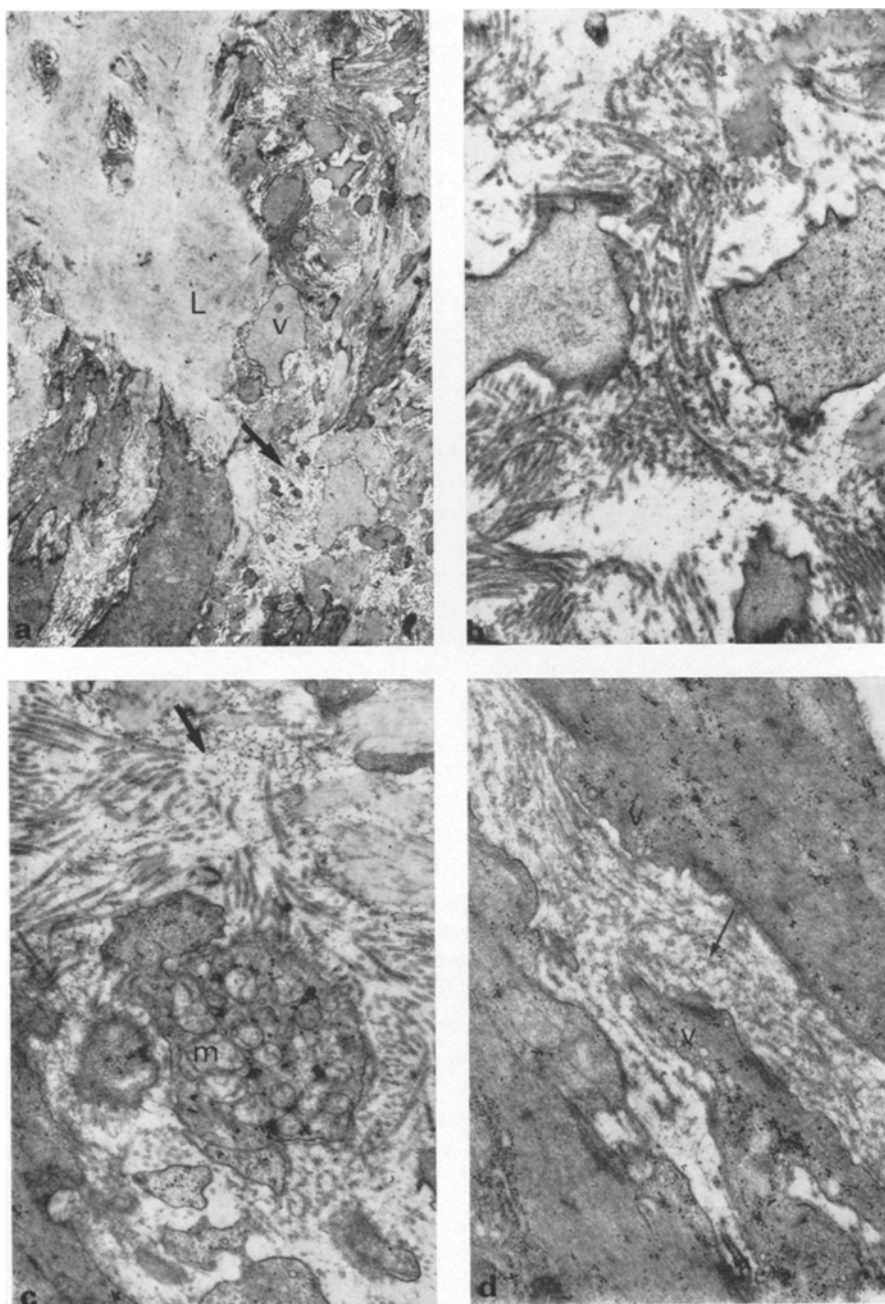
III. Dans les espaces inter-lamellaires, au contact des prolongements, les *transformations de la matrice intercellulaire sont considérables*. Des trousseaux de fibres collagènes adultes y sont visibles en quantité anormale. De même abondent les amas granulaires membranoides, les micro-fibrilles de collagène immature et des agrégats élastiques faiblement contrastés, semés régulièrement de fines granulations et de micro-fibrilles. Enfin, autour de quelques cellules modifiées s'édifient des dépôts linéaires concentriques, granulo-filamenteux, véritables replications de la membrane basale (Fig. 7d).

IV. Hormis ces modifications intra- et extra-cellulaires deux particularités sont constatées dans ces zones lésionnelles.

Dans les myocytes les moins altérés et plus rarement dans la substance inter-cellulaire s'observent quelques *particules lipidiques*. Dans les cellules peu contrastées, elles sont incluses en plein hyaloplasme sans membrane limitante (certaines voisinent avec d'abondants dépôts glycogéniques) (Fig. 8a). Extra-cellulaires, elles sont de plus petites dimensions, fortement osmiophiles, d'aspect lamellaire, en figures myéliniques.

Sur un seul animal sacrifié tardivement (22ème jour) s'observent des *calcifications*. Très opaques, de structure dense ou lamellaire, elles s'accumulent dans les dépôts micro-granulaires ou engainent les fibres collagènes (Fig. 8b). Elles affectent parfois les contours de prolongements cellulaires désinsérés (images linéaires ou tubulées). Aucun dépôt n'est constaté, par contre, sur les lames élastiques.

Fig. 7a—d. Myocytes: prolongements. (a) Multiples expansions au voisinage d'une lame élastique (*l*) et fibrilles collagènes (*f*) nombreuses à leur contact. Polymorphisme de ces expansions, les unes claires (vésicule golgienne *v*), les autres petites et sombres (prolongements rétractés \uparrow). En bas, de la figure, myocytes en souffrance, partiellement désinsérés. Lapin sacrifié au 13 ème jour. G 3200 \times . (b) Expansions avec nombreux ribosomes et fines vésicules. Abondante fibrillogénèse à leur contact. Lapin sacrifié au 13 ème jour. G 15000 \times



(c) Prolongement avec nombreuses mitochondries (*m*) et amas de glycogène au voisinage, autres expansions avec ribosomes et vacuoles. Fibrillogénèse intense intercellulaire et élastogénèse (↑). Lapin sacrifié au 13^{ème} jour. G 120000×. (d) Myocytes modifiés (migrés dans l'intima). Nombreuses vésicules d'endocytose (*v*). Edification granulofilamenteuse abondante, concentrique (replication de la membrane basale ↑). Lapin sacrifié au 13^{ème} jour. G 15000×

Au total, les images observées en microscopie électronique attestent de lésions presque constantes. Frappant essentiellement les myocytes dans les couches profondes de la média dont beaucoup présentent d'évidents signes de dégénérescence, elles suscitent, d'autre part, chez ceux-ci, des modifications «régénératives». Dans ces cellules modifiées et simplifiées ayant perdu leur appareil myo-contractile, l'activité synthétique à l'égard des substances intercellulaires est particulièrement visible au sein de multiples prolongements diverticulaires. Par ailleurs, comme le suggère la microscopie optique, les dépôts lipidiques sont faibles, les altérations intimaux réduites et les précipitations calciques, à ce stade précoce, inhabituelles.

Discussion

Les lésions réalisées par le modèle expérimental que nous avons utilisé, sont d'une fréquence sensiblement égale à celle que nous avons pu établir, grâce à l'histologie conventionnelle, lors d'une série antérieure de plus longue durée (73%) (Brohon *et al.*, 1974). Dans cette expérience nouvelle, l'identité des lésions dans les deux lots d'animaux soumis l'un au seul traitement hormonal, l'autre à un traitement mixte (Adrénaline — Thyroxine et régime hypercholestérolémique) prouve toutefois à l'évidence, à ce stade précoce, le rôle majeur de l'agression hormonale dans le déterminisme des altérations. Les lipides ne sont détectés d'ailleurs qu'en faible abondance dans les cellules de l'endothélium ainsi que dans celles de l'intima et de la média.

A ce stade, les lésions constatées sont pour la plupart submicroscopiques (2 animaux seulement révèlent déjà à l'histologie des plages de médianécrose caractéristiques) (Constantinides *et al.*, 1958). Elles ne sont pas sans rappeler par leurs caractères ultrastructuraux celles provoquées par la nicotine (Gros-gogeat and Roubelakis, 1965) ni sans suggérer par la topographie des altérations histoenzymologiques qui les accompagnent une origine ischémique (Hadjiisky *et al.*, 1973). Elles affectent sur de larges secteurs de la circonférence vasculaire l'armature élastique et surtout les myocytes plus profonds de la média. Ceux-ci sont atteints de signes de déchéance plus ou moins prononcés: simple désinsertion des jonctions myo-élastiques, vacuolisation ou nécrose. Dans l'intima, par contre, hormis la présence de quelques cellules «myo-intimales» et d'une fibrillogénèse appréciable, les altérations demeurent discrètes il s'agit de plages d'oedème identiques à celles décrites par Constantinides and Robinson (1969) après administration d'adrénaline; elles témoignent vraisemblablement d'une dysorie plasmatique hypertensive passagère.

La paroi vasculaire atteste, d'autre part, de perturbations enzymologiques très étendues, hors de proportion avec le caractère segmentaire des modifications dégénératives du myocyte. Cette discordance conduit à s'interroger sur la signification plus précise de chacune des modifications enzymatiques constatées.

1. En dehors des foyers de nécrose où les hydrolases lysosomiales sont abondantes, l'activité des hydrolases acides (ph. acides, B gluc.) s'avère chez tous ces animaux anormalement élevée dans la média externe. Cette augmentation pourrait provenir des altérations myoélastiques et témoigner d'une perméabilité

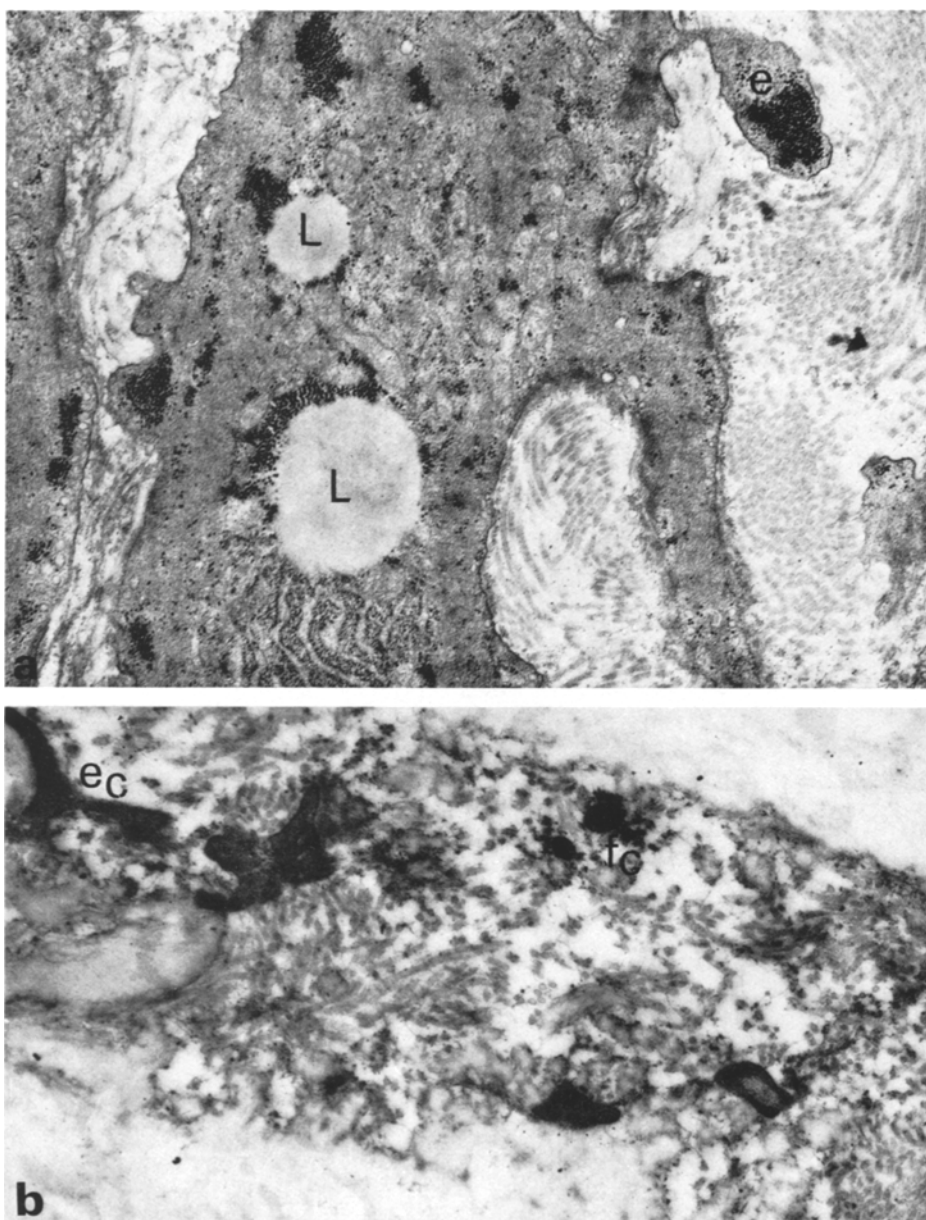


Fig. 8a et b. Lipides et Ca. (a) Inclusions lipidiques (*l*) dans le cytoplasme d'un myocyte. Amas glycogéniques au contact. Petite expansion (*e*) riche en glycogène. Lapin sacrifié au 13^{ème} jour (traitement hormonal lipidique). G 9000 \times . (b) Calcifications de fibres collagènes (*fc*) et d'expansions cellulaires (*ec*) dans un espace interlamellaire. Lapin sacrifié au 23^{ème} jour. G 12000 \times

accrue de la paroi vasculaire avec élévation de la diffusion hydroélectrolytique (Doerr, 1970), dont les conséquences enzymologiques ont été précisées par Postnov (1966).

2. L'activité accrue des estérases, hydrolysant les acides gras à courte chaîne (Postnov, 1966), témoigne en principe d'un accroissement d'apport lipidique vers le myocyte (une élévation de l'activité estérasique a d'ailleurs été décelée dans les stades précoces de l'athérome humain — Brundel, 1972). Dans notre expérience, un peu plus forte chez les animaux soumis au régime, elle proviendrait à la fois de l'hyperlipidémie et de l'accroissement de la diffusion trans-pariétale.

3. Les perturbations de l'activité ATPasique sont de qualité différente selon les cas. Les secteurs d'hypoactivité initiaux deviennent au 12ème jour des zones plus étendues d'inactivité totale. Cet accroissement des perturbations avec la durée de la survie s'accorde avec l'intensité progressivement accrue des destructions myocytaires. Par contre, la forte activité ATPasique visible dans les foyers nécrotiques au contact d'une média inactive, mais morphologiquement peu modifiée, est d'interprétation plus malaisée. La persistance, dans la nécrose, d'une activité ATPasique (en analogie avec les observations de Brundel, 1972), est ici à exclure. Le rôle d'une dédifférenciation progressive des myocytes au contact des zones altérées, la simplification de ceux-ci, singulièrement la disparition de leurs protéines contractiles, sont sans doute à envisager. Ils pourraient conduire, en effet, à la migration dans la nécrose de substances enzymatiques à support myofibrillaire.

4. Les activités respiratoires oxydoréductrices dont on a vu l'inhibition dès les premiers jours de l'expérience retrouvent souvent au 12ème jour une ampleur importante. Ce sont de petites plages sous-intimales, particulièrement actives, notamment pour la L.D. et pour les diaphorases. De tels faits sont signalés par Hadjiisky *et al.* (1973) lors d'immunoartériopathies expérimentales et sont interprétés par lui comme le témoin d'une régénération. Dans nos cas également, ces modifications allaient souvent de pair avec une positivité intense, dans ces secteurs, du test de Brachet.

L'élément sans doute essentiel pour la compréhension de nos constatations et de leur discordance apparente, réside dans la présence, au sein de la média de cellules modifiées. Celles-ci affectent des territoires très étendus et leur «simplification» structurale par rapport aux myocytes dont elles proviennent pourrait rendre compte, dans une large mesure, de la réduction des gradients oxydatifs.

La réparation par régénération myocytaire de toute atteinte vasculaire (Constantinides, 1965; Backwinkel *et al.*, 1973), comme la participation du myocyte à la constitution de plaques athéromateuses (Mac Gee and Asworth, 1963; Geer, 1965; Parker and Oadland, 1966; Wellmann and Volk, 1970) et des lésions intimales de l'hypertension artérielle expérimentale (Aikawa and Koletsky, 1970; Backwinkel *et al.*, 1970) sont actuellement amises et même prouvées par des techniques appropriées (Knieriem, 1970; Borgers, 1973). Impliqué dans de tels processus «régénératifs» ou sclérosants, le myocyte subit, dans une phase initiale, de profondes transformations morphologiques, suggérant à son propos des dénominations variées: cellules myo-intimales (Buck, 1962; Wellmann and Volk, 1970), intermédiaires (Altschul, 1961), modifiées (Geer, 1965; Haust and

More, 1967). Un tel élément est constaté lors de la plupart des agressions expérimentales de la paroi aortique (nicotine, Grosogoeat and Roubelakis, 1965; lathyrisme, Bouissou *et al.*, 1973; immunisation, Robert *et al.*, 1971; irritation traumatique, Bjorkerund, 1969; surcharge en cholestérol, Knieriem, 1967). Sa destinée, variable, le conduit, si l'agression cesse (Stary, 1973) à restaurer la paroi vasculaire et même à reconstituer son propre matériel myofibrillaire (Still and Dennison, 1967; Webster *et al.*, 1974). Dans le cas contraire, du fait d'une différenciation persistante de type fibroblastique il poursuit l'édification de lésions intimo-médiales artérioscléreuses.

Durant notre expérimentation, il était possible de saisir les étapes successives de cette transformation: raréfaction myofibrillaire et apparition périnucléaire de citernes ergastoplasmiques; puis survenue de cellules singulières, volumineuses, claires, peuplées de polysomes et de microvésicules golgiennes. Ces cellules, dépourvues d'aptitudes contractiles sont douées, par contre, on le sait, de capacités sécrétoires intenses (Parker and Oadland, 1966; Knieriem, 1970; Backwinkel *et al.*, 1973): fibrillogénèse collagène, édification de substance fondamentale glycoprotéique (Jurukova and Rohr, 1968).

Ces dernières s'expriment avec le plus d'évidence dans nos cas au contact de multiples expansions cellulaires dont la «spécialisation» golgienne ou ribosomale, apparaît parfois des plus poussée. Au contact de ces diverticules, les espaces intercellulaires révèlent, en effet, une richesse anormale en composantes fondamentales, nouvellement édifiées (dépôts membranoïdes, microfilaments, agrégats élastiques).

En somme, les images observées apparaissent démonstratives d'une régénération particulièrement précoce et active à partir des myocytes modifiés dont toutefois «l'expansion» intimale dans d'autres modèles également artério-nécrosants (Lopes de Faria, 1970) demeure réduite.

Quant aux modifications éventuellement apportées par la thérapeutique préventive par metformin (Agid and Marquie, 1969), elles nous ont paru, au moins dans le petit nombre d'animaux étudiés, peu démonstratives. Chez les 4 animaux soumis à cette drogue, les lésions ne différaient pas dans leur densité et leur qualité de celles de leurs homologues des autres lots. La régénération active s'exprimait par des cellules «modifiées» pourvues d'expansions et la seule particularité résidait, peut-être, dans l'abondance un peu plus grande par rapport aux autres cas de plages glycogéniques. Une telle charge un peu anormale pourrait, si elle se confirmait, corroborer peut-être les modalités d'action glucoséfixatrices du produit utilisé. En tout état de cause, cependant, elle n'explique guère dès ce stade précoce la réduction ultérieure de fréquence des lésions.

Nous adressons nos remerciements à M. Tacne et à A. Bergeron pour leur contribution technique à ce travail et à R. Wolfesperger et G. Martin qui en ont réalisé l'iconographie.

Bibliographie

- Adams, C. W. M.: Vascular histochemistry in relations to the chemical structural pathology of cardiovascular disease. London: Lloyd Luke 1967
- Agid, R., Marquie, G.: Effets préventifs du N.N' diméthylbiguanide sur le développement de l'athérosclérose induite par le cholestérol chez le lapin. C.R. Acad. Sci. (Paris) **269**, 1000—1003 (1969)

- Aikawa, M., Koletsky, S.: Arteriosclerosis of the mesenteric arteries of rat with renal hypertension. *Amer. J. Path.* **61**, 293—304 (1970)
- Altschul, R.: Blood platelets. In: Henry Ford Symposium Hospital, p. 23—39. Boston (Mass.): Little Brown 1961
- Backwinkel, K. P., Schmitt, G., Themann, H., Hauss, W. H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Frühveränderungen der Koronararterien bei experimenteller Hypertonie. *Beitr. path. Anat.* **141**, 374—391 (1970)
- Backwinkel, K. P., Themann, H., Schmitt, G., Hauss, W. H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den verhalten Glattermuskelnzellen in der Arterienwand, unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. *Virchows Arch. Abt. A* **359**, 171—184 (1973)
- Bjorkerund, S.: Reaction of the aortic wall of the rabbit after superfine longitudinal mechanical trauma. *Virchows Arch. Abt. A* **347**, 197—210 (1969)
- Borgers, M.: The origin of subendothelial cells in developing coronary collaterals. *Virchows Arch. Abt. A* **358**, 281—294 (1973)
- Bouissou, H., Julian, M., Pieraggi, M. T.: Approches de l'atherogénèse par le lathyrisme expérimental. *Paroi vasculaire (Arterial Wall) I*, 7—29 (1973)
- Brohon, J., Chomette, G., Sterne, J.: Technique accélérée de production d'une athérosclérose expérimentale chez le lapin. *Paroi artérielle (Arterial wall)*, **II**, 17—27 (1974)
- Bründel, K. H.: Enzyminduktion bei Mediaverfettung menschlicher Coronararterien. *Enzym-histochemische Untersuchungen. Virchows Arch. Abt. A* **357**, 87—98 (1972)
- Buck, R. C.: Lesions in the rabbit aorta produced by feeding a high cholesterol diet followed by a normal diet. An electron microscopic study. *Brit. J. exp. Path.* **43**, 236—240 (1962)
- Constantinides, P.: Experimental atherosclerosis. New York: Elsevier Path. Company 1965
- Constantinides, P., Gutmann-Auersperg, N., Hospes, D.: Acceleration of intimal atherogenesis through prior medial injury. *Arch. Path.* **66**, 247 (1958)
- Constantinides, P., Robinson, M.: Ultrastructural injury of arterial endothelium. III: effects of enzymes and surfactants. *Arch. Path.* **88**, 113—117 (1969)
- Doerr, W.: Allgemeine Pathologie der Organe des Kreislaufes. *Handbuch der allgemeinen Pathologie. T. III/4. Die Organe. Berlin-Heidelberg-New York: Springer* 1970
- Fischer, B.: Über Arterienerkrankungen nach Adrenalininjektionen. *22. Cong. f. Inn. Med.* p. 235, 1905
- Fischer-Wasels, B., Jaffe, R.: in *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie T. VII/2*, Berlin: Springer 1926
- Fontaine, R., Bollak, Cl., Pantesco, V., Ebel, A., Kempf, E., Mack, G.: Recherches expérimentales, histologiques et biochimiques concernant l'athérosclérose expérimentale. *Path. Biol.* **13**, 537 (1965)
- Geer, J. C.: Fine structure of human aortic intimal thickening and fatty streaks. *Lab. Invest.* **14**, 1764—1783 (1965)
- Giordano, A. R., Spraracen, S. C., Hamel, H.: A model for the rapid production of atheromatous lesions in rabbits. *Lab. Invest.* **22**, 94—99 (1970)
- Grosogoeat, Y., Roubelakis, G.: Action expérimentale de la nicotine sur la paroi aortique du lapin. *Etude en microscopie optique et électronique. Path. Biol. (Paris)* **13**, 1140—1156 (1965)
- Hadjiisky, P., Renais, J., Seebat, L.: Immuno-arteriopathie expérimentale du lapin. *Histologie métabolique des lésions récentes. Paroi artérielle (Arterial wall) T. I*, 30—49 (1973)
- Hadjiisky, P., Seebat, L., Renais, J.: Activités hydrolasiques de l'aorte du lapin jeune et adulte. *Bull. Ass. Anat. (Nancy)* **148**, 372—382 (1970)
- Haust, M. O., More, R. H.: Electron microscopy of connective tissues and elastogenesis. in Wagner B. M. et Smiths D. E.: *The connective Tissues*. Baltimore: William et Wilkins 1967
- Helin, P.: Arteriosclerosis in rabbit aorta induced by noradrenaline. The importance of the duration of the noradrenaline action. *Atherosclerosis* **12**, 125—132 (1970)
- Josue, O.: Athérome aortique expérimental par injections répétées d'adrénaline dans les veines. *Presse méd.* 798 (1903)
- Jurukova, Z., Rohr, H. P.: Beitrag zur Bildung bindegewebiger Matrix in glatten Muskelzellen. *Path. Europ.* **3**, 551—570 (1968)

- Kaiserling, C.: Beitrag zur Wirkung intravenöser Suprarenininjektionen auf die Kaninchen-aorta. *Berl. klin. Wschr.* **44**, 29 (1907)
- Knieriem, H. J.: Electron microscopic study of bovine arteriosclerotic lesions. *Amer. J. Path.* **50**, 1035—1065 (1967)
- Knieriem, H. J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Bedeutung der glatten Muskelzellen für die Pathohistogenese der Arteriosklerose. *Beitr. path. Anat.* **140**, 298—332 (1970)
- Knieriem, H. J.: Immunohistochemische Untersuchungen zur Bedeutung der glatten Muskelzellen für die Pathohistogenese der Arteriosklerose des Menschen. *Beitr. path. Anat.* **141**, 4—18 (1970)
- Knieriem, H. J., Bondjers, G., Bjorkerud, S.: Electron microscopy of intimal plaques following induction of large superficial mechanical injury (transverse injury) in the rabbit aorta. *Virchows Arch. Abt. A* **359**, 267—282 (1973)
- Lenegre, J., Beaumont, J. L., Grosogeat, Y.: La paroi artérielle dans l'athérosclérose Malattie cardiovascolari **IV**, 105—124 (1963)
- Lopes de Faria, J.: On the origin of smooth muscle cells in the intimal thickening of rabbit aorta following orthostatic collapse. *Beitr. path. Anat.* **140**, 333—344 (1970)
- Mac Gee, W. G., Asworth, C. T.: Fine structure of chronic hyperarteriopathy in the human kidney. *Amer. J. Path.* **42**, 273—299 (1963)
- Mitschek, G. H. A.: Weitere Untersuchungen über die Wirkung von Solanum Melongena auf die cholesterininduzierte Atheromatose des Kaninchens. Die Histochemie der enzymatischen Veränderungen, Biologie und Schlußbetrachtung. *Exp. Path.* **10**, 167—179 (1975)
- Müller, E., Neumann, W.: Untersuchungen über Esterasreaktivität der Gefäßintima in Bereich atherosklerotischer Herde. *Frankfurt. Z. Path.* **70**, 174—186 (1959)
- Parker, F., Oadland, G. F.: A correlative histochemical and electron microscopic study of experimental atherosclerosis in the rabbit aorta with special reference to the myo-intimal cells. *Amer. J. Path.* **48**, 197—216 (1966)
- Pearse, A. G. E.: *Histochemistry theoretical and applied*. Vol. I, London: Churchill 1968
- Pearse, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. Vol. II, London: Churchill 1972
- Postnov, Iu. V.: Das Verhalten einiger Fermente und Elektrolyte der Gefäßwand bei experimentellen Hypertonie der Ratte. *Virchows Arch. path. Anat.* **341**, 237 (1966)
- Robert, A. M., Grosogeat, Y., Reverdy, V., Robert, B., Robert, L.: Lésions artérielles les produites chez le lapin par immunisation avec l'élastine et les glycoprotéines de structure de l'aorte. *Atherosclerosis* **13**, 427—449 (1971)
- Sary, H. C.: Cell proliferation and ultrastructural changes in regressing atherosclerotic lesions after reduction of serum cholesterol. In: *Atherosclerosis III* (G. Schettler et A. Wetzel eds.), p. 187, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1973
- Still, W. H. J., Dennison, S. M.: Reaction of the arterial intima of the rabbit to trauma and hyperlipemia. *Exp. molec. Path.* **6**, 143—155 (1967)
- Webster, W. S., Bishop, D. V. M., Cleer, J. C.: Morphology and source of intimal cells. *Amer. J. Path.* **76**, 245—265 (1974)
- Wellmann, K. E., Volk, B. W.: Experimental atherosclerosis in normal and subdiabetic rabbits. *Amer. J. Path.* **59**, 39 (1970)

Pr. Dr. Chomette
Hopital Pitié Salpêtrière
83, Bd de l'Hôpital
F-75013 Paris (France)