

Les réactions de la paroi aortique au cours de l'athérosclérose induite chez le lapin par l'administration d'adrénaline-thyroxine et régime hyperlipidique

Etude ultrastructurale et histoenzymologique

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, France

Mesenchymal Reactions of the Aortic Wall in Atherogenesis by Adrenalin-Thyroxin and Fat Diet in Rabbit

Ultrastructural and Histoenzymologic Study

Summary. An initial parenteral injection of adrenalin-thyroxin (1 injection daily for 5 days) followed by a high lipid diet induces an unusual, rapidly occurring atheroma in the rabbit aorta. Previous ultrastructural and histoenzymologic studies of the same model have shown obvious intimal and medial changes, apparently due to the hormonal treatment alone. Repair occurs quickly. The mechanism of atherogenesis is uncertain.

The present study reports the occurrence of obvious atherosclerosis at later stages in this model, when studied by the same methods. The changes are compared with those induced by hormonal treatment alone, allowing some insight into the additional effects of adrenalin and cholesterol on rabbit aorta:

- two sets of 6 experimental animals were killed after one month. In the first group, receiving hormonal treatment alone, the vascular wall is not completely repaired and a change in the histochemical perfusion gradient (elevated level of hydrolase activities of the outer layers of the vessel) remains. In the second group, receiving hormonal treatment and the lipid diet, atheromatous plaques containing lipid containing cells appear at intimal level. These cells develop by migration of myocytes from the medial layer. Cholesterol seems to be the main factor inducing the smooth muscle cell migration and lipid deposition and its proliferative effect is increased by the elevated vascular permeability.

- after adrenalin-thyroxin, 6 animals received the lipid diet for one month and were sacrificed after a further month. Atheromatous plaques were still present and contained higher lipid levels. Medial scarring may disturb the parietal gradient and increase the intimal lipid accumulation found.

Key words: Rapidly occurring atheroma — Adrenalin — Hypercholesterolemia — Histoenzymology — Electron Microscopy — Vascular repair — Experimental atheroma.

Introduction

De connaissance déjà ancienne (Josué, 1903; Anitschkow, 1913; Hueper, 1944), mais de mécanisme encore mal élucidé (Haft, 1975), les lésions aortiques provoquées chez le lapin par les catecholamines apparaissent souvent sévères. Affectant essentiellement la media, y créant des plages de nécrose, elles restent malgré une incrustation calcaire secondaire, très différentes des lésions de l'athérosclérose humaine. Pourtant, en analogie avec d'autres modèles (Giordano et al., 1970; Minick et al., 1973; Trillo et al., 1974), ce type d'agression facilite singulièrement, dans le contexte d'une hyperlipidémie, la survenue secondaire de dépôts athéromateux. Moins de deux mois après une série d'injections préalables d'adrénaline-thyroxine, Constantinides et al. (1958) puis nous-mêmes (Brohon et al., 1974) observons chez le lapin soumis à un régime hyperlipidique des lésions d'athérome aortique caractérisé.

Lors d'une étude préalable (Chomette et al., 1976), nous nous étions attachés aux étapes initiales de cette athérosclérose «accélérée». Moins d'une semaine après le début de l'expérimentation, les modifications sont certes considérables; mais, essentiellement destructives, caractérisées à la fois par une nécrose des cellules musculaires et la fracture des lames élastiques, elles sont en fait imputables au seul traitement hormonal. La surcharge cholestérolique n'y est qu'insignifiante. Par ailleurs, entre le 15^{ème} jour et la 3^{ème} semaine, surviennent les signes d'une réparation précoce s'exprimant par la mobilisation de myocytes épargnés par la nécrose et par la synthèse active de substances intercellulaires collagène et élastique.

Ainsi, la tendance rapidement régressive de ces lésions pariétovasculaires conduit à s'interroger sur le mécanisme de l'étape ultérieure et les raisons du rôle sensibilisateur de l'agression hormonale vis à vis du régime hyperlipidique. Pour tenter de résoudre ce problème, nous nous sommes attachés à l'analyse, par les mêmes moyens ultrastructuraux et histoenzymologiques de ce modèle expérimental à un stade plus évolué. Parallèlement, nous nous sommes efforcés, sur certains lots expérimentaux, de détecter les signes d'un éventuel effet protecteur de la diméthylbiguanide (Metformin), qui nous avait été suggérés par notre expérimentation antérieure (Brohon et al., 1974).

Matériel et méthodes d'étude

Notre étude a porté sur 20 lapins de l'espèce Fauve de Bourgogne, pesant 2,5 à 3 kg. Deux d'entre eux ont été utilisés comme témoins; les autres 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 intraveineuse 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, les animaux ont été répartis en 3 lots de 6 animaux:

- groupe I soumis au seul traitement hormonal et sacrifié après 4 semaines,
- groupe II nourri avec un régime hyperlipidique comportant dans la ration, habituelle 1 gr de cholestérol et 2 gr de graisse de porc (substance riche en acides gras à longue chaîne) et sacrifié après 4 semaines de ce traitement,
- groupe III, nourri par ce régime durant une même période mais sacrifié à la fin du deuxième mois, après un délai de 4 semaines d'alimentation normale.

Par ailleurs, dans le but d'étudier un éventuel effet préventif de la Metformin (Agid et Marquie, 1969). — diméthylbiguanide, la moitié des animaux de chaque lot a subi une semaine auparavant une injection journalière de 250 mg/kg de ce produit et, durant le traitement hormonal, une administration également parentérale de 100 mg/kg.

Dans chaque groupe, de manière à contrôler la spécificité et l'efficacité du régime hyperlipidique athérogène, un dosage des lipides sériques à divers stades de l'expérimentation et une analyse biochimique post-mortem des lipides de la paroi aortique ont été réalisés.

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). 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 a été réalisée:

- sur prélèvements fixés au Bouin et inclus en paraffine. Des colorations appropriées ont été pratiquées pour l'étude morphologique de routine (hématoxyline éosine), la mise en évidence des fibres élastiques (orcéine, fluorescence) et des substances fondamentales (coloration par le P.A.S., le Bleu de Toluidine à pH 3,5),
- sur prélèvements fixés ou formol tamponné (Baker) pour la recherche des graisses (coloration au Soudan).

L'étude histo-enzymologique a été réalisée après immersion des fragments aortiques dans l'azote liquide (10 s) et coupe au cryotome Harris. Différentes activités (ferments respiratoires, enzymes énergétiques, hydrolases acides) ont pu être appréciées (méthodes selon Pearse, 1972). Parmi les enzymes oxydatifs, dans les cycles glycolytiques aérobie et anaérobie, le shunt des pentoses et le cycle de Krebs:

- la glucose 6 phosphatase DH et la 6 phosphogluconate DH,
- la lactate déhydrogénase (L.D.),
- l'isocitrate et la malate DH (M.D.),
- les diaphorases: NADH2 et NADPH2 Tetrazolium reductase (Adams, 1967),
- les ATPases (ATPa) à pH 8,5 et 9,4 et la 5 Nucleotidase, — les hydrolases et enzymes cataboliques: phosphatases alcalines (P.al.), phosphatases acides (P. ac.), estérases non spécifiques à la beta-naphtyl acetate (Nesta), beta-glycuronidase (B.gl), Leucylaminopeptidase, acetyl-thio-cholin-estérase, mono-amino oxydase.

L'étude en microscopie électronique a été réalisée, de manière à préserver l'intégrité de l'intima, par prélèvement sur bourse aortique injectée préalablement de liquide fixateur (Glutaraldehyde). Après fixation complémentaire et post-fixation dans l'acide osmique, inclusion en Epon, les coupes ont été effectuées à l'ultramicrotome L.K.B. Les coupes semi-fines ont été colorées au Bleu de Toluidine. Les coupes fines, contrastées ou non (recherche du Calcium) par l'acétate d'Uranyle et le citrate de Plomb, ont été examinées au microscope électronique Hitachi HU 8.

Résultats

Etude biologique

D'importantes variations du taux des lipides sériques imputables au régime hyperlipidique sont constatées dans 2 des 3 lots expérimentaux. Tandis que, dans le groupe I soumis au seul traitement hormonal, les lipides ne montrent que de faibles variations (taux des lipides totaux initialement de 2,17 g/l et de 3,45 en fin d'expérience; du cholestérol de 0,67 g/l et de 0,71; des phospholipides de 1,28 et de 1,64 g/l), dans les deux autres, en dehors de l'absence de variations des triglycérides, l'élévation des lipides sériques apparaît significative:

— dans le groupe II, lipides totaux, cholestérol et phospholipides accusent après un mois de régime un accroissement considérable; élévation des lipides totaux de 5 à 27 g/l, du cholestérol de 0,69 à 16,80 g/l, des phospholipides de 1,22 à 5,90 g/l.

— dans le groupe III, une hyperlipidémie d'importance comparable est constatée à la fin du premier mois: élévation des lipides totaux de 2,50 g/l à 28,50; du cholestérol de 0,6 à 16,60; des phospholipides de 1,20 à 5,80. Après un mois d'alimentation normale, la lipémie à la fin du deuxième mois demeure encore supérieure à la normale: lipides totaux 7 g; cholestérol 2,10 g; phospholipides 1,80 g.

Parallèlement aux constatations précédentes, l'étude biochimique de la paroi aortique révèle une teneur accrue en lipides, singulièrement en cholestérol. Alors que dans le groupe I, le taux de celui-ci par gramme d'aorte fraîche n'est que de 3,7 mg/g, il atteint dans le groupe II 12 mg/g et s'élève à 16 mg/g chez les animaux du 3^{ème} groupe.

Notons que, par rapport aux animaux homologues du même groupe, ces différentes estimations n'étaient pas influencées par la Metformin.

Etude macroscopique, histologique et histoenzymologique

Sur 18 animaux examinés, 12 présentent sur la crosse aortique des lésions macroscopiques caractérisées: plaques blanchâtres, surélevées (+++), élevures nacrées d'étendue plus faible (+++), stries lipidiques confluentes (++), au minimum simple opalescence de l'intima (+). A une seule exception, toutes se répartissent dans les deux derniers groupes et leur intensité préémine dans le troisième.

Parmi les animaux du premier groupe, en histologie conventionnelle, l'intima est indemne de tout épaississement pathologique. Dans la media ne persistent que quelques modifications de l'armature élastique et de la musculature: rectitude anormale des lamelles et présence, par places, de myocytes «perpendiculaires» (Fig. 1). En histoenzymologie (Tableau 2), les anomalies demeurent appréciables. Du fait d'une desquamation partielle de l'endothélium, la positivité de la phosphatase alcaline est discontinue. Dans la media l'activité ATPasique des myocytes reste médiocre et celle des enzymes oxydatives (M.D., L.D.) inférieure à la normale. Parmi les activités préjugant du gradient de perfusion, la phosphatase acide reste élevée dans la media externe (Fig. 2).

Tableau 1

	0	+	++	+++	++++
groupe I	5		1		
groupe II	1	1	1	2	1
groupe III				4	2

Gradient d'intensité des lésions macroscopiques (0 à +++) selon les groupes étudiés: groupe I et II (longévité 1 mois)
groupe III (longévité 2 mois)

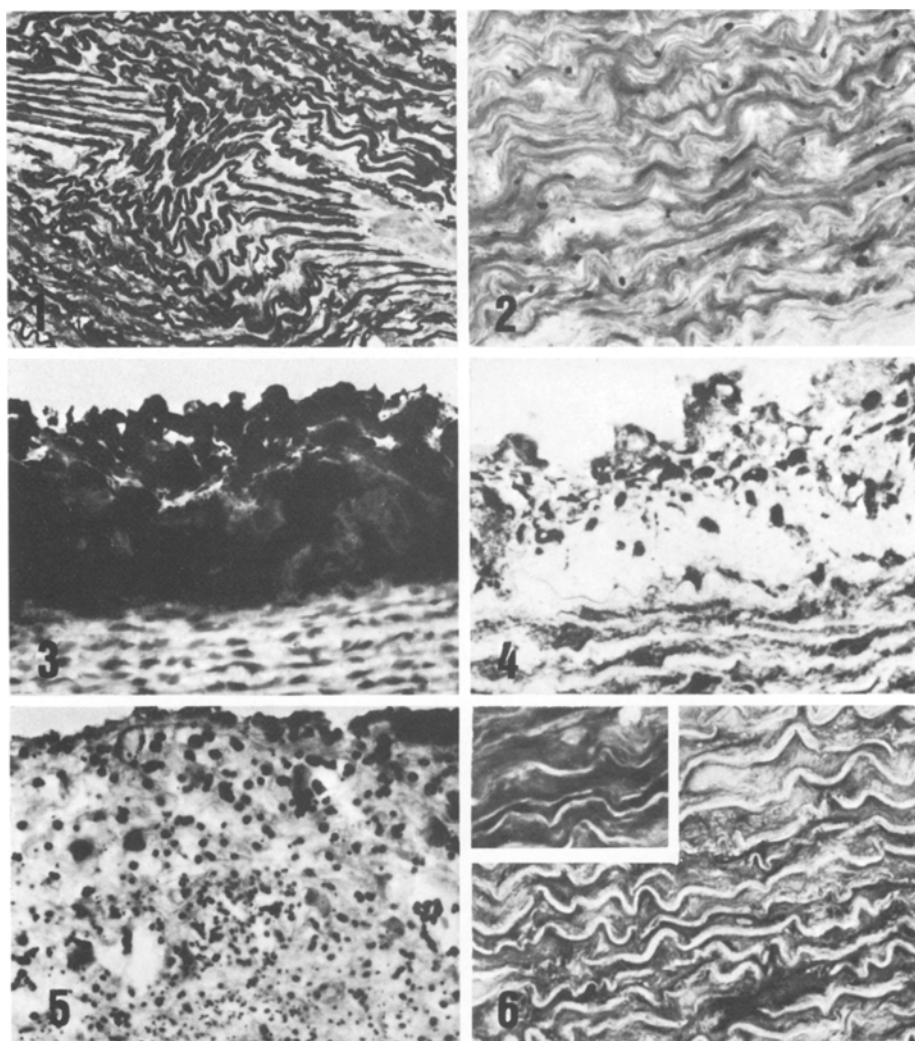


Fig. 1. Media (Groupe I). Nécrose localisée. Irrégularités des dispositifs élastiques. Orcéine. G \times 180

Fig. 2. Media externe (Groupe I). P. ac. Score ++. G \times 350

Fig. 3. Intima (Groupe II). Soudan III. Infiltration lipidique majeure. G \times 200

Fig. 4. Intima (Groupe II). NAD Tetrazolium reductase. Positivité dans les cellules de la plaque et les myocytes de la media sous-jacente. G \times 280

Fig. 5. Intima (Groupe III). P. ac. Positivité intense. Granulations dans les cellules de la plaque athéromateuse. G \times 450

Fig. 6. Media (Groupe III). ATPa, pH 8,5. Positivité irrégulière. G \times 350. Encart: témoin. Positivité intense. G \times 350

Tableau 2

	ATP	LD	MD	PAC	Nesta	P. alc.
Temoins	+++	+++	++	+	±	+
groupe I	+ à ++	+ à ++	+ à ++	+++	± à +	±
groupe II	+	+	+ à ++	++	+ à ++	—
groupe III	±	++	++	±	±	+

Activités histoenzymologiques (gradient d'intensité — à +++) dans les 3 groupes par rapport au lot témoin. Toutes les activités concernent les myocytes de la media, à l'exception de celle de la phosphatase alcaline située dans l'endothelium.

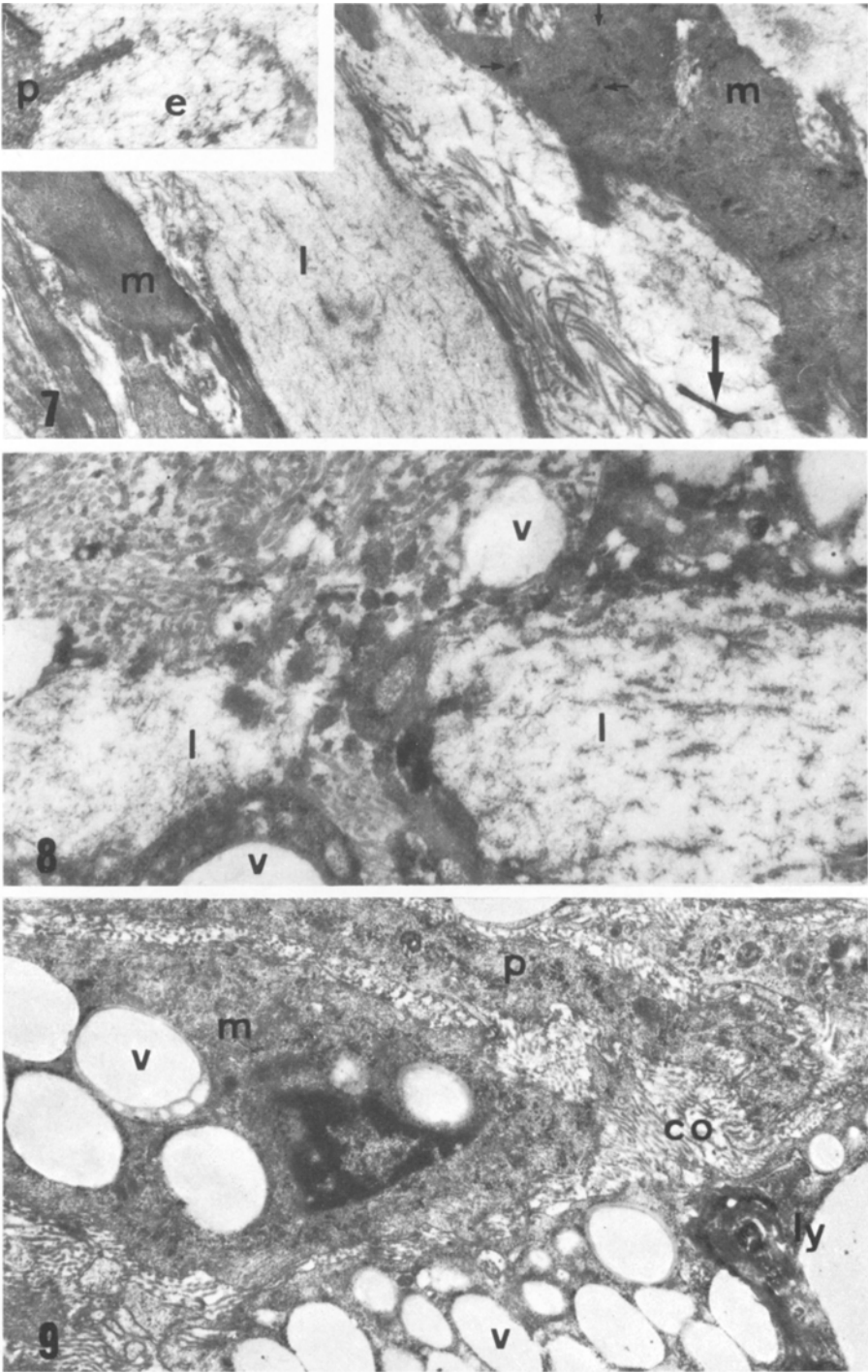
Dans les animaux du deuxième lot, de même longévité que le précédent, les lésions histologiques sont toujours importantes. L'intima comporte une infiltration lipidique soudanophile peuplée de macrophages (Fig. 3). Dans la media, outre quelques plaques nécrotiques et une rectitude persistante des lames élastiques, de gros myocytes stellaires sont visibles dans les espaces. En histoenzymologie sont constatées dans les macrophages de l'intima d'importantes activités enzymatiques oxydatives (LD, Nad — Fig. 4), hydrolasiques (P. Ac.) et estérasiques. Dans la media (Tableau 2), les activités énergétiques et oxydatives sont plus réduites que dans le groupe précédent et la restauration ATPasique très faible (ceci en contraste avec une forte positivité de l'enzyme sur les plaques nécrotiques). Les activités liées au gradient de perfusion (P. Ac.) restent élevées et la Naphtolestérase, à l'inverse du groupe précédent, atteste d'une forte positivité.

Dans le dernier lot (groupe III), les plages lipidiques sont épaissies et saillantes. Par contre, les modifications de la media semblent un peu moindres (agencement plus régulier, horizontal, des myocytes; lames élastiques à nouveau flexueuses). Dans l'intima, l'endothelium réparé recouvre une positivité normale de la phosphatase alcaline; hydrolases acides (Fig. 5) et estérases sont très positives, granulaires au sein des macrophages. Dans la media (Tableau 2), les enzymes oxydatives (MD, LD) présentent une positivité presque comparable à celle du groupe témoin, mais l'activité ATPasique y demeure très faible (Fig. 6). La faiblesse des réactions de la phosphatase acide et de la naphtol-estérase y suggère d'autre part une réduction de la perfusion pariétale.

Fig. 7. Groupe I. *Media*. Lames élastiques parallèles (l) et myocytes (m) allongés. A noter l'importance, dans les myocytes, de ribosomes et à leur contact de plages de mucopolysaccharides avec fibre collagène calcifiée (→). G × 8000. Encart: prolongement (p) et elastine (e) en formation, riche en microfilaments. G × 20000

Fig. 8. Groupe II. *Limitante élastique interne* (l) fracturée. De part et d'autre myocytes chargés de vacuoles lipidiques (v). G × 15000

Fig. 9. Groupe II. *Intima*: macrophage avec vacuoles (v) lipidiques et lysosome (Ly) Cellule musculaire (m) vacuolisée (v) et prolongement (P). Feutrage collagène (co) important entre les cellules. G × 8000



Etude ultrastructurale

Selon les groupes expérimentaux, les modifications observées dans l'intima et la media aortique apparaissent différentes. Ces anomalies ne sont pas influencées, cependant, lorsqu'il a été administré, par un éventuel traitement par la Metformin.

Groupe I. Dans l'intima, l'endothelium, en dehors de larges secteurs d'exfoliation, apparaît turgescent, bourré de vacuoles de pinocytose. Le conjonctif sous-endothélial, très mince, n'héberge que de très rares cellules allongées de type musculaire.

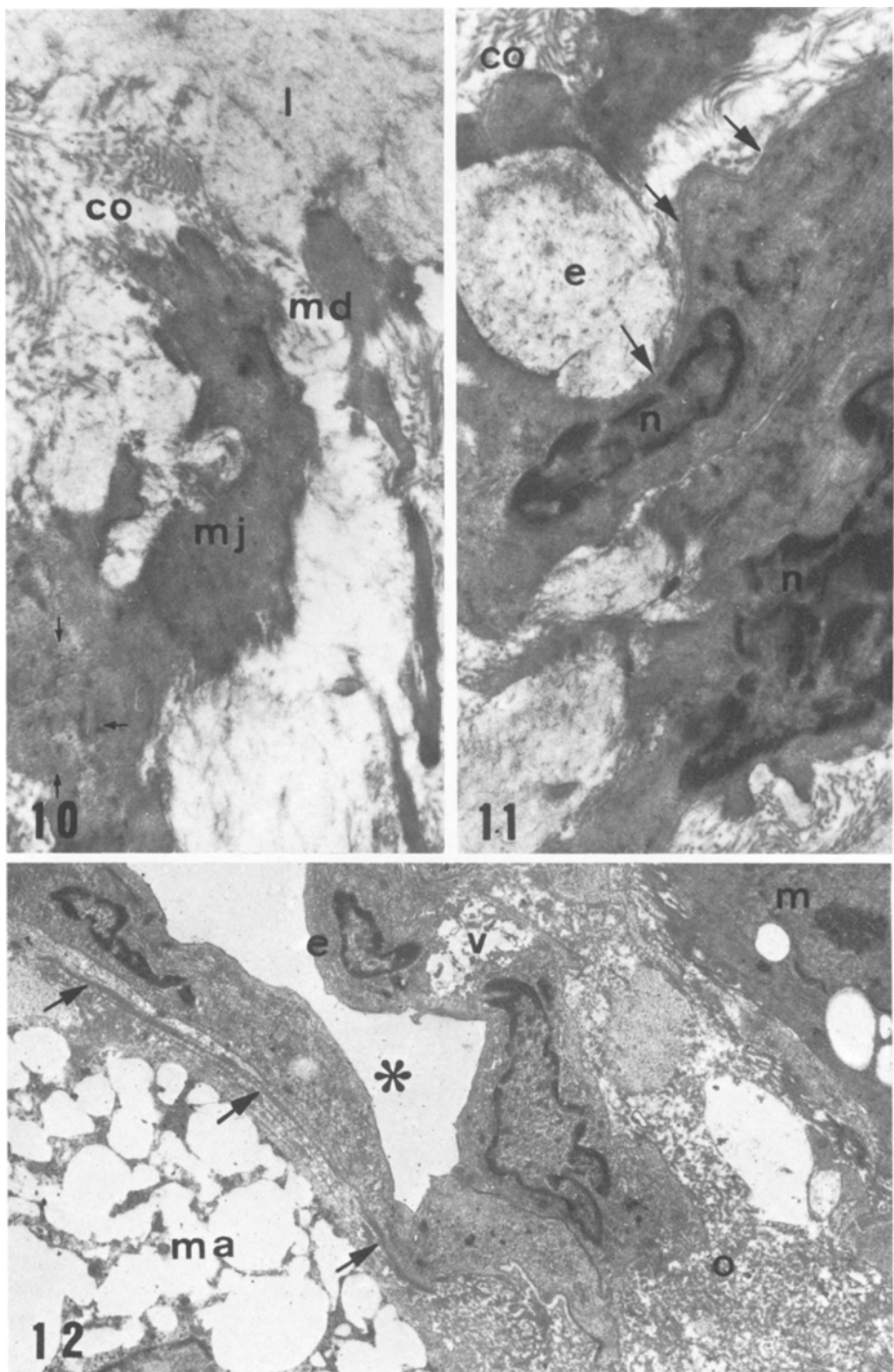
Dans la media, les lames élastiques, en particulier la limitante élastique interne (LEI), continues, comportent de place en place quelques secteurs jeunes, riches en microfilaments, sans doute récemment reconstitués. Entre elles, dans les espaces, les myocytes sont dans l'ensemble régulièrement disposés en files longitudinales (Fig. 7). Leur corps, allongé et sombre, bordé de vacuoles d'endocytose, héberge des myofilaments bien visibles. Leurs prolongements effilés sont régulièrement ancrés dans les lames élastiques voisines. Pourtant, dans une proportion importante, ils demeurent globuleux, pourvus d'organites périnucléaires bien visibles (ergastoplasme granulaire, mitochondries, système golgien) et de myofilaments périphériques; leurs prolongements sont nombreux, souvent volumineux, arrondis ou piriformes. A leur contact immédiat s'observent des plages et des globes d'élastine néoformée, peuplée encore d'un fin réseau microfilamentaire (Fig. 7). De nombreuses fibres collagènes émanent également, en trousseaux, des prolongements cellulaires. D'autres apparaissent clairsemées au sein de plages abondantes, transparentes aux électrons, de mucopolysaccharides. Par ailleurs, correspondant aux mutilations nécrotiques vues en microscopie optique, quelques zones anhistes, granulaires sont circonscrites par d'épais trousseaux collagènes provenant de fibroblastes actifs, pourvus de dispositifs ergastoplasmiques très développés. Toutes ces modifications laissent place dans la media externe à des structures cellulaires et intercellulaires normales.

Au total, un mois après l'agression hormonale, la réparation vasculaire est presque achevée. L'endothelium demeure cependant partiellement exfolié et dans

Fig. 10. Groupe II. *Media* et *limitante élastique interne* (l): myocytes perpendiculaires, les uns sombres, homogénéisés avec prolongements desinsérés (*md*), les autres jeunes (*mf*) à cytoplasme clair avec nombreux ribosomes et fibrillogénèse collagène (*co*). G \times 8000

Fig. 11. Groupe II. *Media*: myocyte proliférant à deux noyaux (*n*). A son contact, lame basale (\rightarrow), élastigénèse (*e*) et fibrillogénèse collagène active (*co*). G \times 20000

Fig. 12. Groupe III. *Intima*: endothelium continu en bordure de la lumière vasculaire (*) et lame basale épaissie (\rightarrow). Cellule endothéliale (*e*) saillante avec vacuole lipidique (*v*). Oedème (*o*) granulo-vacuolaire sous-endothélial. Dans la plaque, macrophage à vacuoles confluentes (*ma*) et myocyte «engraissé» (*m*) à vacuoles périnucléaires. G \times 5500



la media, outre la persistance de quelques cellules nécrotiques, se poursuit encore de la part de myocytes jeunes et actifs la consolidation des armatures conjonctives.

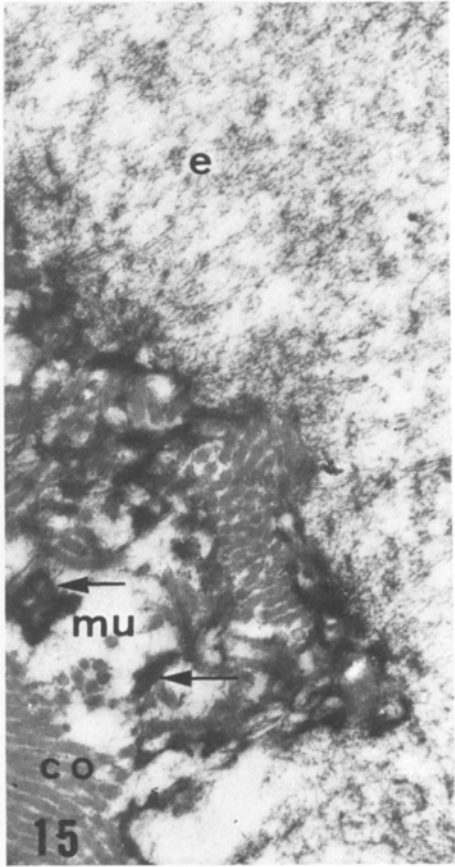
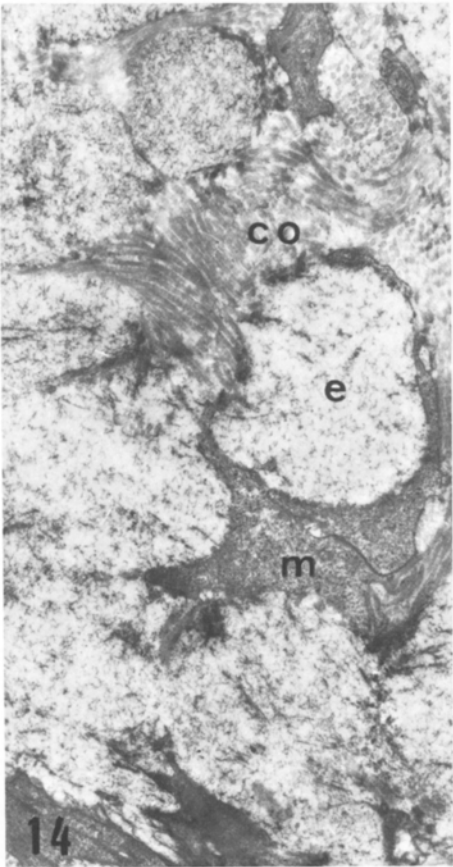
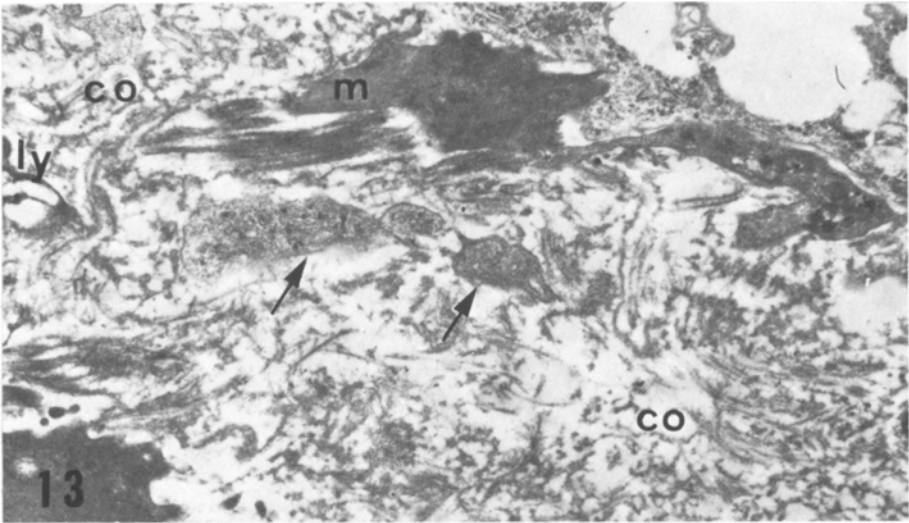
Groupe II. L'intima, très épaisse, y est presque dépourvue de revêtement endothélial. Elle est occupée par un très grand nombre de cellules bourrées de vacuoles lipidiques sans membranes, appartenant à deux catégories morphologiques (Fig. 8). Les unes, arrondies, à hyaloplasme clair, pourvues de nombreux organites (ergastoplasme très développé, citernes et vésicules golgiennes nombreuses, lysosomes abondants) ont l'apparence de macrophages. Les autres, sombres, pourvues de prolongements, de myofilaments et de membranes basales, sont de type musculaire; vacuoles lipidiques et organites y sont concentrés dans la région perinucléaire. Entre ces éléments, s'observent quelques plages claires où le contour du feutrage collagène apparaît souvent renforcé par de fines calcifications étoilées.

Dans la *media*, les lames élastiques, notamment la L.E.I., comportent des interruptions persistantes et quelques «cals» exubérants. Les premières sont soulignées par de minces liserés calcaires fortement contrastés et il n'est pas rare d'y constater la pénétration de myocytes chargés de lipides (Fig. 9). Les seconds sont formés de plages d'élastine jeune, riche en microfilaments. Dans les espaces, les cellules musculaires sont irrégulièrement orientées (Fig. 10). Les unes, rétractées, à cytoplasme sombre et homogénéisé, sont manifestement en dégénérescence; leurs prolongements, désinsérés, sont parfois calcifiés. Les autres, claires et volumineuses, attestent, malgré leur relative dédifférenciation, d'une activité métabolique et proliférative importante (Fig. 11). Ce sont des myocytes globuleux, parfois binucléés; La rareté des myofilaments et la pauvreté de l'endocytose y contrastent avec l'abondance des autres organites (ergastoplasme, Golgi et mitochondries); les plus proches de la L.E.I. contiennent en outre des vacuoles lipidiques. Leurs prolongements, courts, presque sessiles, abondent en ribosomes et parfois en microvésicules. Au contact de ces myocytes s'observe par ailleurs une élastigénèse intense. Celle-ci s'élabore par replication et conversion granulo-filamenteuse des membranes basales. De plus, une fibrillogénèse collagène considérable émane des prolongements cellulaires et les plages claires de mucopolysaccharides, peuplées de fibres calcifiées, se montrent plus particulièrement développées. Comme dans le groupe précédent, la media externe

Fig. 13. Groupe III. *Intima*: cellule musculaire (*m*) nécrosée et calcifiée. Feutrage collagène (*co*) abondant renfermant, outre des prolongements de cellules (→) des organites cellulaires libres (corps lysosomiaux *Ly*). G × 8000

Fig. 14. Groupe III. *Media*: cellule musculaire (*m*) riche en myofilaments, prolongements acuminés, mais comportant encore des ribosomes et des mitochondries. Gros nodules d'élastine (*e*) jeune et collagène (*co*) abondant, irrégulièrement disposé autour du myocyte. G × 8000

Fig. 15. Groupe III. *Media*: élastine jeune (*e*), collagène (*co*) et mucopolysaccharides (*mu*). Calcifications (→) étoilées ou linéaires sur les fibres collagènes et en bordure des blocs d'élastine. G × 25000



ne comporte aucune modification caractérisée (myocytes normaux sans infiltration lipidique ni activité lysosomale insolite).

Dans ce groupe s'observent en somme deux ordres de modifications. Dans l'intima apparaissent des plages épaisses dont la cellularité importante, gorgée de vacuoles lipidiques, procède d'une infiltration de macrophages et de cellules musculaires migrées. Dans la media, d'autre part, des altérations dégénératives persistantes suscitent de la part de cellules musculaires lisses une régénération désordonnée et une élaboration considérable de matériel conjonctif, en particulier élastique.

Groupe III. Malgré un mois d'arrêt du régime hyperlipidique, l'intima y présente une morphologie comparable à celle du groupe précédent. Toutefois, l'endothélium est maintenant continu (Fig. 12). Les cellules, turgescentes ou même cubiques, unies les unes aux autres par des interdigitations lâches, y témoignent d'une activité fonctionnelle importante: nombreuses vésicules de micropinocytose, ergastoplasme abondant, grande quantité de corps lysosomiaux, figures myéliniques cernant les inclusions lipidiques. Sous l'endothélium la lame basale épaissie surmonte une zone oedémateuse, réticulée et vacuolaire. Dans l'épaisseur de la plaque, les cellules, macrophages et myocytes, montrent maintenant une intense activité lysosomale: nombreux lysosomes granulo-vacuolaires ou figures myéliniques contournées cernant les vacuoles paranucléaires de myocytes. De plus, beaucoup de ces éléments sont frappés de dégénérescence (Fig. 13): confluence de vacuoles, densification homogène du cytoplasme, libération extracellulaire de lipides ou de corps lysosomiaux. Par ailleurs, les substances conjonctives sont plus abondantes: fibres collagènes, accumulation autour des basales cellulaires de matériel élastique et de plages de mucopolysaccharides. Les microcalcifications, plus nombreuses, incrustent les fibres collagènes, les débris cellulaires et même quelques membranes basales de myocytes.

Dans la *media*, les interruptions des lames élastiques laissent place à de gros calcs d'élastine jeune. Les myocytes présentent encore des dispositions anormales (Fig. 14). Beaucoup demeurent stellaires et leurs prolongements, bien qu'ancrés dans les blocs ou les lames élastiques, restent globuleux. Dans les corps cellulaires hypertrophiés, les trousseaux myofilamentaires abondants laissent voir encore des organites nombreux (mitochondries disséminées, ribosomes, ergastoplasme granulaire et même dispositifs golgiens). Des vacuoles lipidiques libres ou accolées à des lysosomes y sont souvent visibles. Des substances intercellulaires trop abondantes englobent ces myocytes dystrophiques: nodules confluents d'élastine (Fig. 14), feutrage collagène dense, plages mucopolysaccharidiques peuplées de fibres collagènes calcifiées (Fig. 15).

Les modifications de ce groupe sont ainsi également originales. Dans l'intima, sous l'endothélium restauré (mais sans doute anormalement perméable), beaucoup de cellules myoïdes et macrophagiques, exerçant vis à vis des lipides une activité catabolique, entrent en dégénérescence. Parallèlement, s'observe à leur contact un enrichissement en substances intercellulaires et en dépôts calciques. Par ailleurs, la réparation de la media s'avère dystrophique, contraignant les myocytes emmurés dans de gros blocs élastico-collagènes à des dispositions irrégulières et à des ancrages anormaux.

Discussion

Avant d'aborder le problème posé par la survenue d'un athérome aussi rapide, il convient tout d'abord de préciser quelques traits morphologiques et morphodynamiques de ce modèle expérimental.

L'endothélium, détruit durant la première phase de l'expérimentation (Constantinides et al., 1969), est restauré à la 8^{ème} semaine. Toutefois, à cette date encore précoce et en analogie avec les constatations de Webster (1974), sa perméabilité reste vraisemblablement altérée; ainsi en atteste l'aspect oedémateux et granulo-vacuolaire du tissu conjonctif sous-endothélial (Knieriem, 1970) (Fig. 12). Par ailleurs, l'élévation des activités hydrolasiques (B-GLU et P. Ac. — Fig. 2) dans les myocytes de la media externe, bien que sans correspondance ultrastructurale patente, fournit là comme en d'autres circonstances (Postnov, 1966; Wolinsky, et al., 1975; Coltoff-Schiller et al., 1976) une bonne indication d'une épuraison transpariétale excessive et d'un gradient de perfusion anormalement élevé (Jellinek, 1974).

D'autre part, quels que soient les lots expérimentaux, la réaction mésenchymateuse de la media est constante. Elle fait appel à des myocytes jeunes (Fig. 11), proliférants (images de binucléation), pourvus de nombreux prolongements globuleux (Backwinkel et al., 1973; Hauss, 1974). Les myofilaments y apparaissent clairsemés, les mitochondries nombreuses et réparties dans tout le cytoplasme, l'ergastoplasme granulaire et l'appareil de Golgi particulièrement apparents. Notons qu'avec le régime de surcharge lipidique, ces éléments mobilisés, en migration vers l'intima (Fig. 9) se chargent de vacuoles graisseuses sans membrane (Knieriem, 1970) vis à vis desquelles quelques uns exercent une activité lysosomale intense. Toutes ces cellules font preuve dans l'ensemble d'activités enzymatiques proportionnelles à la qualité et à l'importance numérique de leurs organites sub-cellulaires. Toutefois, malgré un stock mitochondrial important, les activités oxydatives restent souvent paradoxalement faibles (Tableau 2, Fig. 5). De plus, à une phase tardive de la réparation, la restauration des myofilaments ne s'accompagne pas toujours d'une reprise des activités ATPasiques (Tableau 2, Fig. 6).

Durant toutes les phases de l'expérimentation, ces myocytes élaborent, grâce à de multiples expansions peuplées de ribosomes et de microvésicules, des substances intercellulaires variées (Fig. 14). Des blocs d'élastine riche en microfilaments s'édifient au contact de leur lame basale. Le collagène émane en gros faisceaux de leurs prolongements. Enfin, en connexion intime avec les cellules, des mucopolysaccharides s'individualisent en plages claires au sein desquelles de nombreuses incrustations calcaires soulignent le contour des fibres collagènes (Figs. 9 et 13).

Notons enfin que, quels que soient le groupe expérimental et le protocole utilisés, un effet préventif de la Metformin sur ces diverses altérations n'a pu être confirmé.

Comme nous l'avions montré antérieurement (Chomette et al., 1976) dans la genèse des modifications constatées, l'administration d'adrénaline-thyroxine joue, à elle seule, un rôle déterminant. Initialement, ce traitement, en analogie avec d'autres modes d'attrition vasculaire (Grosogeat et al., 1965; Robert et al.,

1971; Hauss, 1974), provoque des dégâts considérables: exfoliation de l'endothélium (Constantinides, 1969), fracture des lames élastiques et nécrose des myocytes. D'importantes perturbations enzymologiques en sont alors le reflet: perte d'activité de la phosphatase alcaline dans l'endothélium, chute dans les myocytes des activités ATPasiques et oxydatives, accroissement en parallélisme avec l'augmentation de la perméabilité pariétale, de leurs activités hydrolasiques.

Très rapidement, en réponse à cette agression, apparaissent vers le 8^{ème} jour les signes d'une réparation active; des myocytes «mobilisés» assurent la refection des armatures médiales élastiques et collagènes. A la fin du premier mois, comme le montre notre groupe II, la réédification se montre très avancée et presque normale. L'intima, à l'inverse des constatations effectuées dans d'autres modèles traumatiques, est demeurée mince, sans cellule migrée. Dans la media, les fractures élastiques ne sont plus visibles et les myocytes, pour la plupart, réinsérés.

Toutefois, certains indices dans la media attestent encore d'une réparation inachevée: immaturité des myocytes (Fig. 7) peu fournis en myofibrilles et pauvrement dotés d'activités enzymatiques; organisation encore irrégulière et mal systématisée des substances intercellulaires dont les agencements restent encore très différents du modelage des aortes normales (Fig. 1). En conjonction avec les dehiscences de l'endothélium, cette persistance à quelque degré des disjonctions elastico-musculaires explique sans doute le maintien à cette période d'une perfusion accrue (Doerr, 1970) et d'un score élevé des phosphatases acides (Fig. 2).

Chez les animaux soumis au même traitement hormonal, l'adjonction d'un régime riche en cholestérol suscite, en même temps qu'une hypercholestérolémie majeure, des lésions d'athérome particulièrement typique et précoce (Constantinides et al., 1958; Shimamoto, 1972) (Fig. 3). Après 4 semaines apparaissent les plaques observées avec le seul régime après des temps beaucoup plus longs (en moyenne 3 à 6 mois; Lenègre et al., 1963; Fontaine et al., 1965); comme le révèlent les dosages biochimiques, ces dépôts vont de pair avec un enrichissement considérable de la paroi vasculaire en cholestérol.

En morphologie ultrastructurale, l'aspect des lésions intimaes est en tout point démonstratif. Les macrophages, chargés de vacuoles lipidiques sans membrane, sont ceux rencontrés habituellement dans l'athérome au cholestérol (Fig. 8): cellules rondes, riches en ergastoplasme et lysosomes de nature vraisemblablement macrophagique (Barbolini et al., 1969; Björkerud, 1969; Meessen et al., 1975); éléments myoïdes (Geer, 1965; Parker et al., 1966; Borgers, 1973) beaucoup plus nombreux, allongés, pourvus de prolongements, de membranes basales, voire d'attributs myofibrillaires. Comme le révèlent les incidences favorables, ces derniers proviennent de migrations massives à travers la L.E.I. de myocytes de la media (Fig. 9) (Constantinides, 1965; Knieriem, 1970; Webster et al., 1974).

Après un mois de cessation du régime, la paroi vasculaire, comme en attestent les dosages, s'enrichit encore en cholestérol et les lésions sont loin de régresser (Gupta et al., 1970; Sary, 1974). Sous l'endothélium reconstitué, très riche en microvésicules de pinocytose, en organites, peuplé lui-même de vésicules lipidiques (Knieriem, 1970), les cellules acquièrent des activités hydrolasiques

considérables. Le lysosome produit dans les vésicules golgiennes des macrophages fusionne aux vacuoles lipidiques (Saio et al., 1974) et forme avec celles-ci des corps granulovacuolaires (Fig. 13) ou des figures myeliniques dont l'activité phosphatase acide et estérasique est considérable (Muller et al., 1959) (Fig. 4). Enfin, en similitude avec les lésions d'athérosclérose cholestérolique, la destruction des phagocytes y est rapidement intense. Libérant dans les espaces extracellulaires lipides et organites, elle apparaît en quelque sorte «compensée» par une production très abondante de mucopolysaccharides et de fibres collagènes.

Dès lors, comment comprendre la genèse, sous l'effet préalable du traitement hormonal, d'un athérome hypercholestérolémique aussi précoce?

La comparaison, entre les trois groupes, des caractères morphologiques et histoenzymologiques de la réparation médiale fournit à cet égard des arguments démonstratifs:

— Alors que chez les animaux soumis au seul traitement hormonal, la restauration de la media, au premier mois, est très avancée, dans le groupe II de même longévité cette réparation reste beaucoup plus précaire. Les myocytes mobilisés et en migration conservent des dispositions irrégulières et, parmi eux, s'observent de nombreuses cellules en souffrance (Fig. 10). Outre une réduction plus importante des scores énergétiques et oxydatifs, l'histoenzymologie démontre, malgré l'épaisseur de la plaque intimale, une élévation encore franche des tests de perfusion (Tableau 2). Sans doute, les phosphatases acides sont-elles un peu moins élevées que dans le groupe précédent, mais le score important des estérases atteste bien d'une pénétration profonde des lipides et d'une hydrolyse importante de ceux-ci (Postnov, 1966).

— Après deux mois, la réparation est, certes, très élaborée mais ses caractères sont franchement dystrophiques (Fig. 14, 15). Les substances intercellulaires emmurent les myocytes dans des plages élastiques et mucofibrillaires peuplées de fines calcifications (Meessen et al., 1975). Les connexions insolites de ceux-ci expliquent sans doute, malgré la restauration de leur matériel myofibrillaire et de leurs enzymes oxydatives (Fig. 5), l'insuffisance persistante de leurs activités ATPasiques. Une telle cicatrisation dysharmonieuse, en conjonction à la fibrose intimale, rend compte alors d'un obstacle majeur à la perfusion pariétale (Hauss, 1974), d'une négativation des activités enzymologiques correspondantes à celle-ci et d'un enrichissement progressif de la plaque intimale en cholestérol.

Il est ainsi possible d'envisager le mécanisme physiopathologique de cette athérosclérose selon les étapes suivantes:

— dans un premier temps, le traitement hormonal, notamment les catecholamines, par l'action conjuguée de multiples facteurs (effet propre de l'adrénaline sur l'endothélium, spasme du vaisseau et vasoconstriction des vasa vasorum — Haft, 1975 —), engendrent de considérables désordres: désinsertion endothéliale, fracture des lames élastiques et nécrose des cellules musculaires. Sous l'effet d'une mobilisation et d'une multiplication des myocytes, les lésions tendent à se réparer rapidement. Néanmoins, des déhiscences endothéliales persistantes et la restauration insuffisante de l'armature médiale rendent compte, à la 4^{ème} semaine, d'une perfusion pariéto-vasculaire encore excessive.

— ainsi, la paroi vasculaire est-elle particulièrement «sensibilisée» aux effets de la seconde agression, celle du régime hyperlipidique. Celui-ci, à la faveur de l'accroissement de la perfusion, exerce, en effet, son action au cœur de la media sur des myocytes déjà mobilisés dont il suscite à son tour la prolifération (Fischer-Ozoga et al., 1974). Dans de telles conditions, on peut comprendre l'ampleur et la rapidité inhabituelles (Clowes et al., 1976) de la réponse médiale à l'hyperlipidémie.

— La signification, dès cette période, d'accumulations graisseuses dans l'intima prête davantage à discussion. S'agit-il, à la faveur d'un gradient élevé, d'une accumulation rétrograde, par suite de l'incapacité des cellules de la media à faire face à un gradient accru et à une épuration lipidique trop importante? Suggérée par l'élévation dans la media externe des activités estérasiques, cette hypothèse ne trouve cependant en ultrastructure aucune confirmation (absence dans les myocytes externes d'endocytose intense ou de lysosome très apparent). Par contre, la production en grande

quantité au contact des cellules engraissées de mucopolysaccharides nous paraît revêtir une plus grande signification. Les mucopolysaccharides exercent, en effet, un rôle d'arrêt vis à vis des vecteurs du cholestérol (Hauss, 1973; Walton, 1974), favorisant à cette occasion les microprécipitations calcaires dont nous avons vu la fréquence dans nos documents.

— Quant à l'évolution lésionnelle tardive, la réparation dysharmonieuse de la paroi vasculaire et la réduction extrême du gradient de perfusion en sont, selon nous, les agents essentiels. L'absence de perfusion (Hauss, 1973; Hauss, 1974) faciliterait, en effet, malgré la restauration endothéliale les nouvelles accumulations de lipides, la sclérose intimo-médiale consécutive et la constitution alors définitive de la plaque athéroscléreuse.

Nous adressons nos remerciements à M. Tacnet et à A. Lesot pour leur contribution technique à ce travail et à R. Wolessperger 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' dimethylbiguanide sur le développement de l'athérosclérose induite par le cholestérol chez le lapin. C.R. Acad. Sci. (Paris) **269**, 1000–1003 (1969)
- Anitschkow, N.: Experimental arteriosclerosis in animals. In: Arteriosclerosis (E.V. Cowdry ed.) p. 271–322. New York: Mac Millan 1933
- Backwinkel, K.P., Themann, H., Schmitt, G., Hauss, W.H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den verhalten Glatter Muskelzellen in der Arterienwand, unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Virchows Arch. Abt. A Path. Anat. **359**, 171–184 (1973)
- Barbolini, G., Scilabra, G.A., Botticelli, A., Botticelli, S.: On the origin of foam cells in cholesterol-induced atherosclerosis of the rabbit. Virchows Arch. Abt. B Zellpath., **3**, 24–32 (1969)
- Bjorkerud, S.: Reaction of the aortic wall of the rabbit after superficial longitudinal mechanical trauma. Virchows Arch. Abt. A Path. Anat. **347**, 197–210 (1969)
- Borgers, M.: The origin of subendothelial cells in developing coronary collaterals. Virchows Arch. Abt. A Path. Anat. **358**, 281–294 (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)
- Chomette, G., Auriol, M., Brohon, J., Sterne, J.: Modifications précoces, histoenzymologiques et ultrastructurales, de l'aorte chez le lapin après injections d'adrénaline-thyroxine et régime hyperlipidique. Virchows Arch. A, Path. Anat. and Histol. **369**, 293–313 (1976)
- Clowes, A.W., Ryan, G.B., Breslow, J.L., Karnovsky, M.J.: Absence of enhanced intimal thickening in the response of the carotid arterial wall to endothelial injury in hypercholesterolemic rats. Lab. Invest. **35**, 6–17 (1976)
- Coltoff-Schiller, B., Goldfischer, S., Adamany, A.M., Wolinsky, H.: Endocytosis by vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. Roles of vesicles and lysosomes. Amer. J. Path. **83**, 45–60 (1976)
- 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-Ozoga, K., Jones, R.M., Vesselinovitch, D., Wissler, R.W.: Increased mitotic activity in primary cultures of aortic medial smooth-muscle cells after exposure to hyperlipemic serum. In: Atherosclerosis III (G. Schettler et A. Wetzel eds.). Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1974
- Fontaine, R., Bollak, Cl., Pantescio, V., Ebel, A., Kempf, E., Mack, G.: Recherches expérimentales

- histologiques et biochimiques concernant l'arteriosclérose 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)
- Glagow, S., Chung-Hsin Ts'ao: Restitution of aortic wall after sustained necrotizing transmural ligation injury. Role of blood cells and artery cells. *Amer. J. Path.* **79**, 7–30 (1975)
- Grosogeat, 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)
- Gupta, P.P., Tandon, H.D., Ramalingaswami, V.: Experimental atherosclerosis in rabbits with special reference to reversal. *J. Path.* **101**, 309–317 (1970)
- Haft, J.I.: Atteinte cardiovasculaire provoquée par les catécholamines. *Acquisitions nouvelles en pathologie cardio-vasculaire*, **17**, 123–144 (1975)
- Hauss, W.H.: Über die Rolle des Mesenchyms in der Genese der Arteriosklerose. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.* **359**, 135–156 (1973)
- Hauss, W.H.: Mesenchymal cellular reaction and consequences. In: *Atherosclerosis III* (G. Schettler et A. Wetzel eds.). Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1974
- Hauss, W.H.: Influence de la réaction du mésenchyme sur la teneur, la synthèse et le transport des lipides dans la paroi des artères. *Path. Biol. (Paris)* **22**, 651–660 (1974)
- Haustr, 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 and Wilkins 1967
- Hueper, W.C.: Arteriosclerosis. *Arch. Path.* **38**, 245–285 (1944)
- Jellinek, H.: What indications are there that permeability is altered and which factors affect it in atherosclerosis? In: *Atherosclerosis III* (G. Schettler et A. Wetzel eds.), Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1974
- 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)
- Knieriem, H.J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Bedeutung der glatten Muskelzellen für die Pathohistogenese der Arteriosklerose. *Beitr. path. Anat.* **140**, 298–332 (1970)
- Lenegre, J., Beaumont, J.L., Grosogeat, Y.: La paroi artérielle dans l'athérosclérose. *Malattie cardiovascolari* **IV**, 105–124 (1963)
- Meessen, H., Kojimahara, M., Franken, T., Rhedin, P., Huth, F.: Alteration of the rabbit aorta following feeding of cholesterol diet in combination with sheathing of aortic segments by polyethylen tubes. *Beitr. path. Anat.* **154**, 218–232 (1975)
- Minick, C.R., Murphy, G.E.: Experimental induction of atheroarteriosclerosis by the synergy of allergic injury to arteries and lipid-rich diet. II Effect of repeatedly injected foreign protein in rabbits fed lipid-rich, cholesterol-poor diet. *Amer. J. Path.* **73**, 265–300 (1973)
- Muller, E., Neumann, W.: Untersuchungen über Esteraseaktivität der Gefäßintima im Bereich atherosklerotischer Herde. *Frankfurt. Z. Path.* **70**, 174–186 (1959)
- Parker, F., Odland, G.F.: A correlative histochemical and electron microscopic study of experimental atherosclerosis in the rabbit aorta with special reference to the myointimal cells. *Amer. J. Path.* **48**, 197–216 (1966)
- Pearse, A.G.E.: *Histochemistry theoretical and applied*. London: Churchill 1972
- Postnov, Ju.V.: Das Verhalten einiger Fermente und Elektrolyte der Gefäßwand bei experimentellen Hypertonie der Ratte. *Virchows Arch. path. Anat.* **341**, 237–244 (1966)
- Robert, A.M., Grosogeat, Y., Reverdy, V., Robert, B., Robert, L.: Lésions artérielles produites chez le lapin par immunisation avec l'élastine et les glycoprotéines de structure de l'aorte. *Atherosclerosis* **13**, 427–449 (1971)
- Ross, R.: The smooth muscle cell. II-Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J. Cell Biol.* **50**, 172–186 (1971)
- Shimamoto, T.: Cité par Hauss, W.H.: Morphological and histochemical alterations in injury and arterial tissue. *Internat. College of Angiology*. London 1972
- Saio, H., Farquhar, M.G., de Duve, Ch.: Arterial wall. IV Cytochemical localisation of acid

- phosphatase and catalase in smooth-muscle cells and foam cells from rabbit atheromatous aorta. *Amer. J. Path.* **76**, 1–16 (1974)
- 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. 186, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1974
- Trillo, A., Renaud, S., Haus, M.D.: The role of hypertension and hyperlipemia in the morphogenesis of experimental atherosclerosis. In: *Atherosclerosis III* (G. Schettler et A. Wetzel eds.) p. 366, Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1974
- Walton, K.W.: Lipoproteins- connective tissue interactions. In: *Atherosclerosis III* (G. Schettler et A. Wetzel eds.), Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1974
- Webster, W.S., Bishop, D.V.M., Cleer, J.C.: Morphology and source of intimal cells. *Amer. J. Path.* **76**, 245–265 (1974)
- Webster, W.S., Bishop, S.P., Cleer, J.C.: Experimental aortic intimal thickening. II Endothelialization and permeability. *Amer. J. Path.* **76**, 265–284 (1974)
- Wolinsky, H., Goldfischer, S., Daly, M.M., Kasak, L.E., Coltoff-Schiller, B.: Arterial lysosomes and connective tissue in primate atherosclerosis and hypertension. *Circ. Res.* **36**, 553–561 (1975)

Reçu le 27 juin 1977