

Étude ultrastructurale des histiocytes bleu marine dans une lipidose splénique idiopathique avec surcharge en céroïdes

M. Reynès, R. Kalifat et J. Diebold

Faculté de Médecine, Broussais-Hôtel-Dieu, Laboratoire d'Anatomie
et de Cytologie Pathologiques, Paris

Reçu le 27 avril 1973

Ultrastructural Study of Blue Histiocytes in a Case of Idiopathic Lipidosis of the Spleen with Ceroid Overload

Summary. An ultrastructural study was performed in a patient with spleen lipidosis with ceroid overload. The different inclusions observed in histiocytes of the pulp rods are described. According to the lesions observed three types of histiocytes are differentiated with sequential evolution starting with phagocytosis of blood cells and ending with overload of ceroids. The latter is characterized by true myeline figures related to the granules observed optically in the blue histiocytes.

This case without particular etiology belongs to the blue histiocytes syndrome described by Silverstein. The different diseases in which such histiocytes are observed are reported. The physiopathological meaning of this histiocytosis is discussed.

Résumé. Un cas de lipidose splénique avec accumulation de céroïdes est étudié en microscopie électronique. Les différentes inclusions des histiocytes des cordons pulpaire sont décrites. Leur groupement réalise trois types d'histiocytes macrophages réalisant une séquence commençant par la phagocytose de cellules sanguines et aboutissant à une surcharge en céroïdes. Cette dernière est faite d'inclusions constituées de figures myéliniques vraies correspondant aux grains visibles en microscopie optique des histiocytes bleu marine. Ce cas, sans étiologie particulière, entre dans le cadre du syndrome des histiocytes bleu marine de Silverstein. Les différentes affections au cours desquelles existent de tels histiocytes sont rapportées. La signification physiopathologique de cette histiocytose est discutée.

La description de macrophages contenant de volumineux granules d'un bleu intense après coloration par les solutions de May-Grünwald-Giemsa peut être trouvée dans le traité de Moeschlin (1951) sur la ponction splénique. De telles cellules ont été reconnues parfois dans des maladies fort différentes. Mais en 1970, Silverstein *et al.* réunissant sous le terme «sea blue histiocyte syndrome» un certain nombre de malades présentant une symptomatologie évocatrice d'une affection de surcharge et possédant des histiocytes à grains bleu marine dans la rate et/ou la moëlle osseuse, sans qu'aucune étiologie ne soit reconnue. Les études ultrastructurales de ces cellules sont fort rares. Nous avons eu l'occasion de pratiquer une telle étude chez un malade présentant une lipidose splénique avec accumulation de céroïdes prouvée par les études histochimiques.

Constatations cliniques, biologiques et histochimiques

Elles ont fait l'objet d'une publication détaillée (Diebold *et al.*, 1972), brièvement résumée ici.

* Travail du Service Central d'Anatomie Pathologique (Pr. Ag. J. Diebold) et du Laboratoire de Microscopie Electronique de l'U.E.R. des Cordeliers

Une splénomégalie est découverte lors d'un examen clinique systématique chez un homme de 31 ans, sans antécédents particuliers. Une neutropénie avec thrombopénie est alors découverte, représentant la seule modification hématologique. La moëlle osseuse est en effet normale. Une splénectomie est effectuée devant l'augmentation progressive de cette rate. Les explorations biologiques ultérieures montrent une élimination élevée des mucopolysaccharides urinaires ($15,3 \text{ mg}^0/_{00}$) alors que les lipides sanguins et le lipidogramme sont normaux¹. L'examen histologique de la rate découvre la surcharge lipidique.

Dans cette grosse rate de 620 g, macroscopiquement normale, les cordons pulpaire sont infiltrés de nombreux macrophages. Certains contiennent des vésicules claires, d'autres sont occupés par de multiples grains bleu marine après coloration par le May-Grünwald-Giemsa, enfin un troisième type contient, à la fois, des granules et des vésicules.

L'étude histochimique montre que ces grains sont faits d'un lipopigment, de coloration brunâtre, autofluorescent, insoluble dans les solvants organiques et acido-alcool-résistant. Le caractère polyinsaturé de ces lipides est démontré par la réaction à l'acide performique Schiff. Ces différents caractères sont habituellement considérés comme très évocateurs des céroïdes.

Techniques d'étude ultrastructurale

C'est à partir de fragments congelés dès la splénectomie que sont effectués les prélèvements pour l'étude ultrastructurale. Ils sont fixés dans du glutaraldéhyde à 6,5% pendant 1 heure puis post-fixés au tétroxyde d'osmium durant une heure, déshydratés et inclus dans la résine epoxy (Epon 8/12) selon la méthode de Luft. Les coupes ont été effectuées sur un ultramicrotome Porter-Blum avec couteau de verre et examinées au microscope électronique Siemens Elmiskop 1 après coloration par l'acétate d'uranyle à pH 5 pendant 20 minutes et par le citrate de Plomb selon Reynolds pendant 10 minutes.

Résultats

1. Les macrophages des cordons

Parmi la population cellulaire des cordons de la pulpe rouge splénique, s'observent de très nombreuses cellules de grande taille (40 à 60 microns), riches en organelles cytoplasmiques et inclusions d'aspect varié. Ces dernières leur donnent un aspect original. Ces cellules ont toutes un noyau semblable. D'assez grande taille, nucléolé, il présente une membrane très sinueuse avec une hétérochromatine marginale et a les caractères d'un noyau d'histiocyte. Le cytoplasme de ces cellules présente souvent un aspect filamenteux marqué. Les inclusions très polymorphes peuvent être groupées en deux catégories:

a) *Inclusions lamellaires.* Il s'agit d'inclusions arrondies, très osmiophiles, dont le diamètre varie entre 0,5 et 1,5 micron (Fig. 1). Chaque inclusion est constituée de plusieurs granules disposés les uns contre les autres et cernés par deux à quatre enroulements de membranes parallèles. Ces granules sont eux-mêmes faits d'enroulements de membranes strictement parallèles, ayant ainsi les caractères de figures myéliniques vraies (Fig. 2). La périodicité est assez constamment de 60 Angstroms. Cette disposition réalise l'aspect qualifié d'empreintes digitales.

On observe également des enroulements de membranes beaucoup moins réguliers, disposés de telle façon qu'aucune périodicité ne peut être retrouvée, réalisant de fausses figures myéliniques (Fig. 3). Les zones situées entre les membranes sont transparentes aux électrons ou occupées par un matériel faiblement osmophile de nature lipidique. Ces inclusions sont souvent cernées par une membrane unitaire et ont ainsi un caractère de lysosome secondaire.

Un troisième type d'enroulement membranaire réalise des aspects proches du précédent mais est constitué de membranes plus fines et est situé dans le hyaloplasme sans limites nettes (Fig. 4).

1 Étude des lipides sanguins et du lipidogramme effectuée par le Pr. Ag. Guy-Grand.

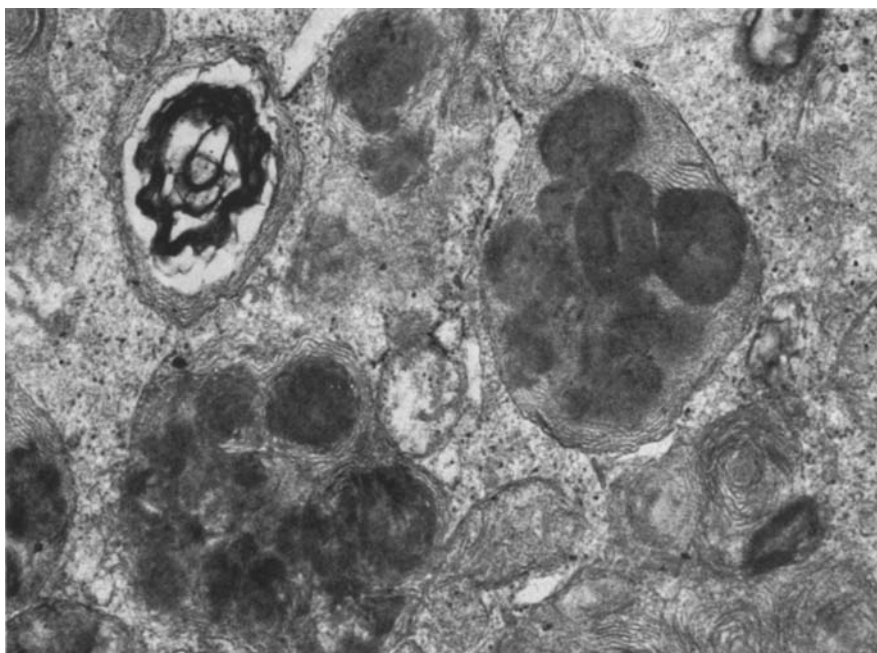


Fig. 1. Inclusions faites de plusieurs granules juxtaposés. En haut à gauche, fausse figure myélinique. $G = 30000 \times$

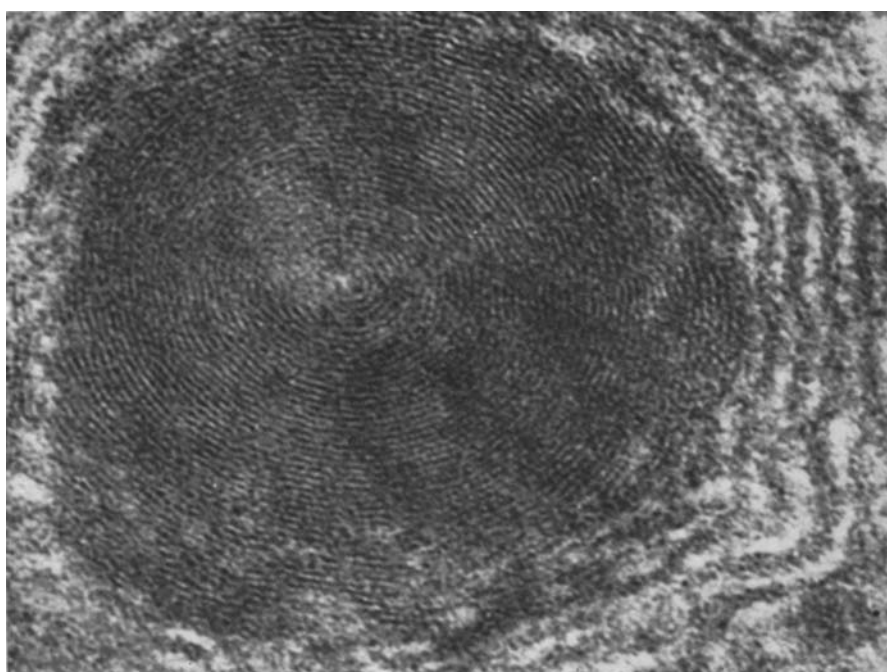


Fig. 2. Enroulements membranaires réalisant une « empreinte digitale » avec une périodicité de 60 Angströms. $G = 400000 \times$

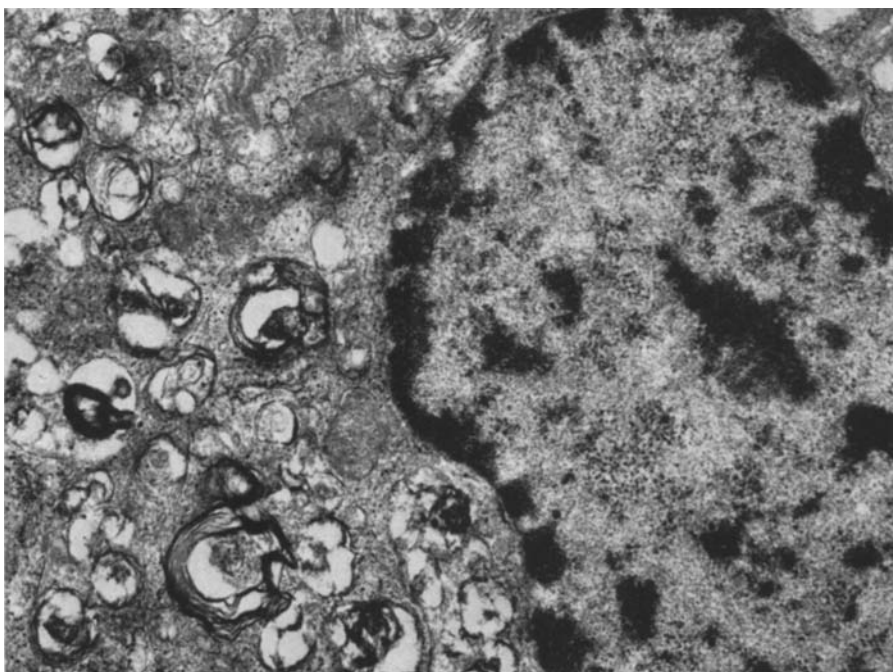


Fig. 3. Nombreuses fausses figures myéliniques avec aspect vacuolaire clair ou légèrement osmophile. $G = 13\,000\times$

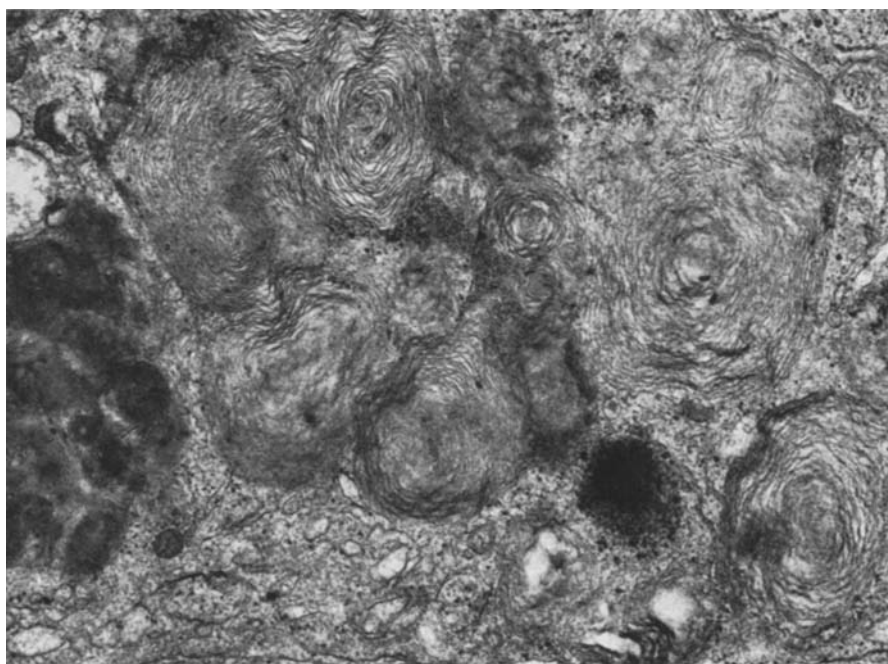


Fig. 4. Enroulements membranaires présentant un aspect feuilleté sans périodicité régulière. $G = 26\,000\times$

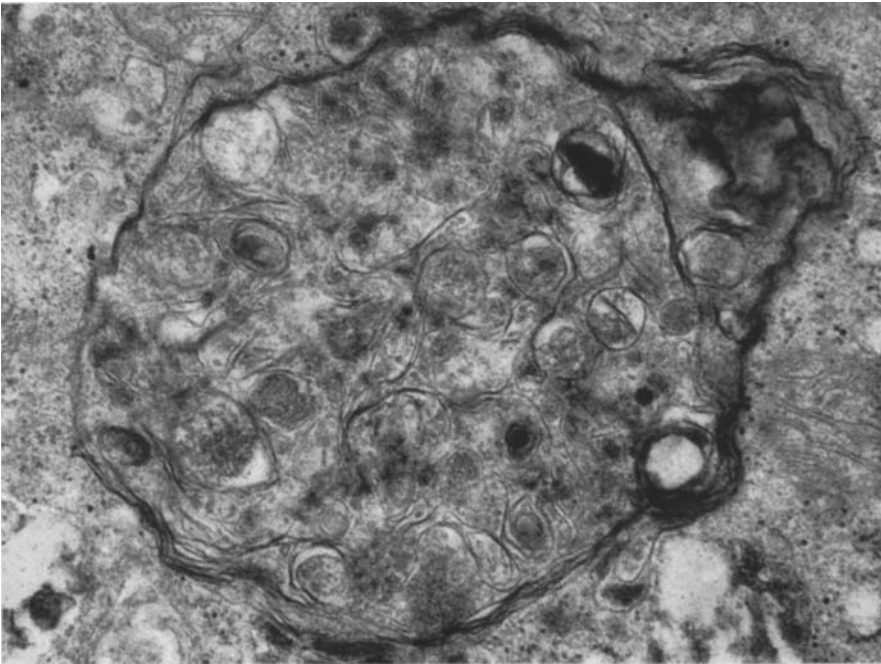


Fig. 5. Phagosome complexe fait de vésicules plus ou moins osmiophiles et cerné de membranes.
G = 36000 \times

Ces derniers aspects sont diversement associés à de multiples vésicules claires ou osmiophiles réalisant des phagosomes complexes (Fig. 5). On note enfin la présence de quelques empilements de membranes au niveau de la membrane nucléaire ou cytoplasmique de ces histiocytes.

b) Cellules sanguines phagocytées. Certains histiocytes, en effet, contiennent des cellules sanguines phagocytées à des étapes variables de digestion. Ces cellules de différents types sont ainsi plus ou moins identifiables. On reconnaît souvent à leur périphérie une membrane unitaire limitant ainsi un phagosome.

La plupart des cellules sont des hématies aisément reconnaissables lorsqu'elles viennent d'être phagocytées car elles conservent leur morphologie. Leur cytoplasme prend l'aspect finement granuleux plus ou moins osmiophile après lyse de la membrane cellulaire. A un stade de dégradation plus avancé, les hématies sont réduites à des mottes osmiophiles cernées de structures membranaires irrégulières prenant un aspect feuilleté (Fig. 6).

Des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles peuvent aussi être phagocytés. Leurs noyaux présentent une chromatine répartie en mottes (Fig. 7). Leurs lysosomes et en particulier les granulations cristallines des polynucléaires éosinophiles facilitent leur reconnaissance. Enfin, des plaquettes phagocytées sont également rencontrées (Fig. 8).

Fréquemment des débris cellulaires dont l'origine est difficile à préciser sont mêlés à des amas de membranes irrégulièrement disposés, réalisant des phagosomes complexes déjà cités plus haut.

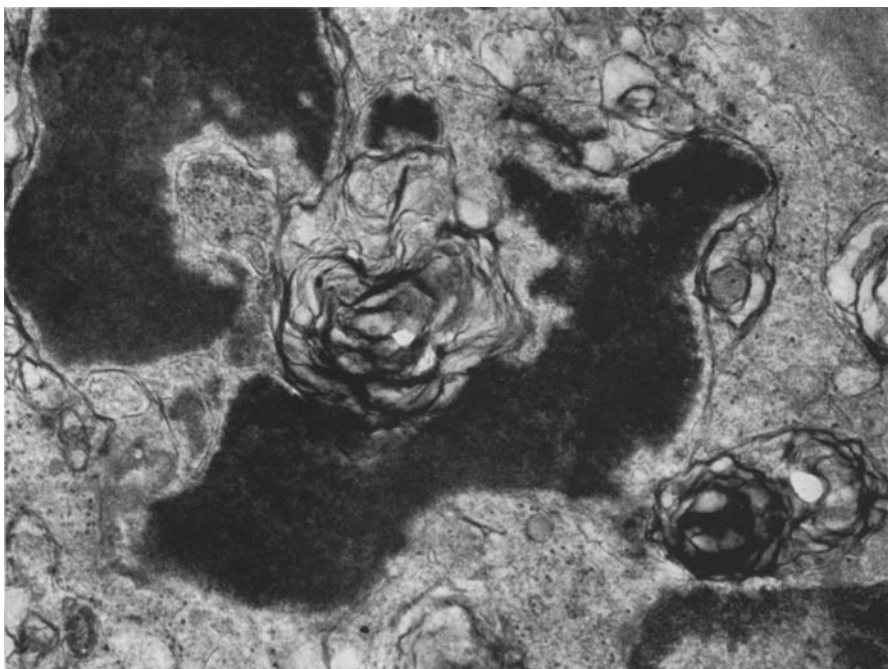


Fig. 6. Hématies phagocytées en cours de digestion entourées de membranes irrégulières.
G = 25000 \times

c) Ces modifications cytoplasmiques s'associent de façon variable, permettant ainsi d'individualiser trois types de cellules.

Un premier type représente la plus grande partie des macrophages des cordons de Billroth. Ces cellules contiennent des phagosomes, divers types de cellules phagocytes et des amas de fausses figures myéliniques plus ou moins enroulées. Un deuxième type comprend des histiocytes dont le cytoplasme est occupé par des images plus avancées de phagocytose, des fausses figures myéliniques et de très rares figures myéliniques vraies. Le troisième type enfin est fait d'histiocytes moins nombreux, dont le cytoplasme est entièrement occupé par des figures myéliniques vraies (Fig. 9) dont le groupement réalise les grains mis en évidence en microscopie optique par le May-Grünwald-Giemsa. Ces cellules sont des histiocytes «bleu marine». Il existe rarement entre ces grains quelques enroulements membranaires moins réguliers réalisant des faits de passage.

2. Situation des histiocytes macrophages dans la pulpe rouge splénique

Ces histiocytes macrophages occupent la plus grande partie des cordons pulpaire. Ils y sont souvent groupés au voisinage des artères pénicillées et de leurs capillaires terminaux. Entre eux on observe de rares histiocytes sans activité macrophagique visible ainsi que des hématies, quelques lymphocytes, plaquettes et polynucléaires.

Dans la lumière des sinus, on observe aucun histiocyte macrophage. Les cellules endothéliales qui les bordent sont de morphologie normale, sans aucune surcharge ni témoin d'activité macrophagique.

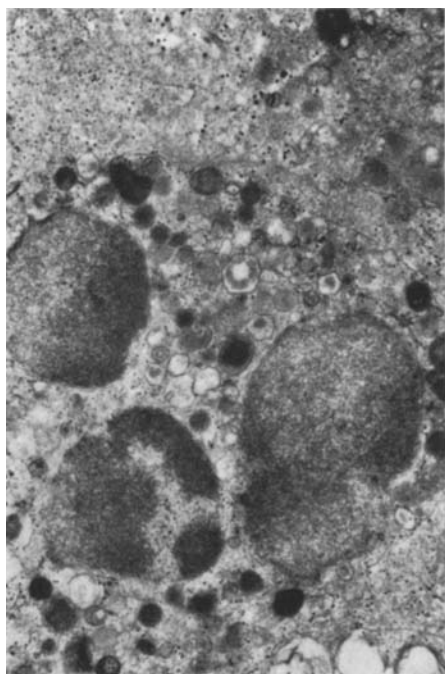


Fig. 7

Fig. 7. Polynucléaire neutrophile phagocyté. $G = 25000 \times$

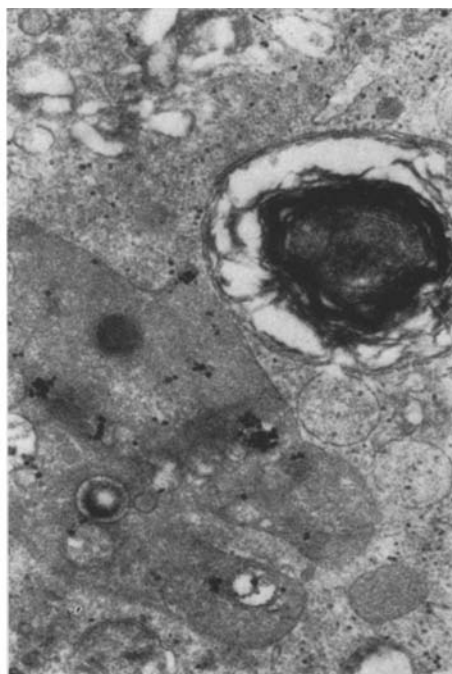


Fig. 8

Fig. 8. Plaquette phagocytée à côté d'une fausse figure myélinique. $G = 25000 \times$

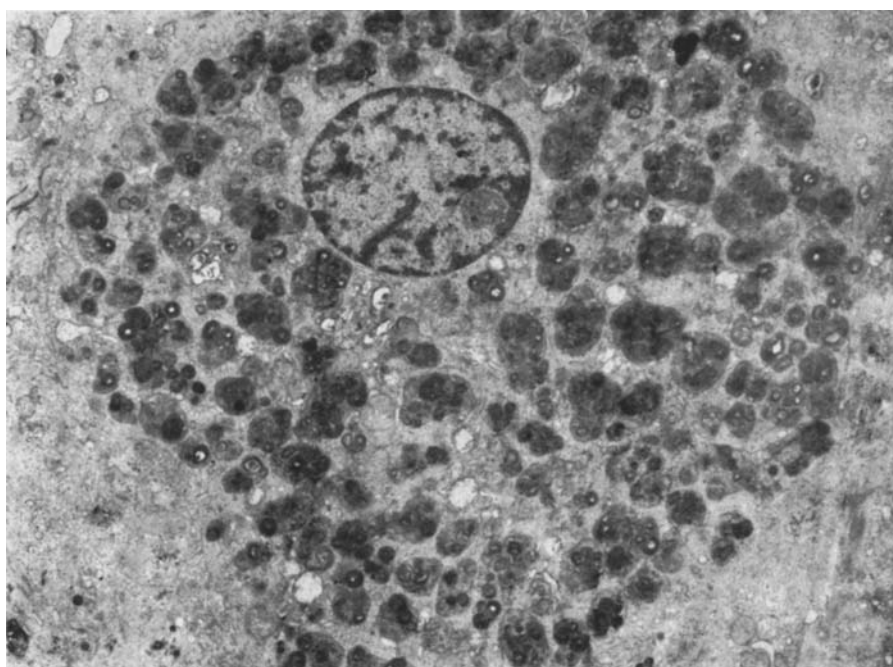


Fig. 9. Histiocyte à grains correspondant aux histiocytes bleu marine en microscopie optique.
 $G = 4000 \times$

Discussion

L'étude ultrastructurale de ce cas permet de constater une séquence liant la phagocytose de cellules sanguines par des histiocytes macrophages spléniques et leur digestion à l'apparition d'une surcharge en céroïdes. Les étapes successives de la dégradation des cellules sanguines phagocytées montrent bien qu'elle aboutit à l'apparition de fausses figures myéliniques d'abord puis de figures myéliniques vraies. Celles-ci représentent l'aspect élémentaire des grains constituant le surcharge en céroïde.

Les nombreuses études histochimiques (Pappenheimer, 1946; Pearse, 1960; Hartroft, 1965; Porta, 1969) consacrées à ces lipopigments particuliers que sont les céroïdes ont montré qu'ils étaient surtout constitués d'acides gras poly-insaturés. Ce caractère lié à une oxydation plus ou moins importante des acides gras les rapprochent des lipofuscines. Pearse (1960) soutient une théorie uniciste suivant laquelle les céroïdes se transformeraient en lipofuscines au fur et à mesure qu'augmente l'oxydation des acides gras qui les constituent.

Selon diverses publications, les aspects ultrastructuraux correspondant à la définition histochimique des céroïdes sont très variables. Certains (Hartroft, 1965; Porta, 1969) les décrivent comme des mottes complexes plus ou moins osmiphiles et multivésiculaires ressemblant à ce que d'autres ont décrit comme lipofuscines. Dans d'autres travaux (Howes *et al.*, 1964; Samorajski *et al.*, 1965; Biava, 1956; Gyorky *et al.*, 1967; Ferrans *et al.*, 1971; Rywlin *et al.*, 1971), ce sont des enroulements de membranes qui sont décrits comme caractéristiques des céroïdes. Ces enroulements présentent une morphologie d'empreintes digitales comparables aux structures que nous avons nous-même observées. Cette variabilité dans les aspects ultrastructuraux rend compte peut être de la filiation possible (Pearse, 1960) entre lipofuscines et céroïdes.

Cette surcharge en céroïdes réalisant des histiocytes bleu marine est observée dans des affections fort différentes. Il s'agit de maladies avec hyperdestruction cellulaire, au cours de certaines leucémies myéloïdes chroniques (Sundberg *et al.*, 1964; Kattlove *et al.*, 1969; Lee, 1971; Dosik *et al.*, 1972), de thrombocytopénies isolées ou faisant partie d'un purpura thrombopénique idiopathique (Landing *et al.*, 1961; Saltztein, 1961; Hill *et al.*, 1963; Dollberg *et al.*, 1965; Quinton, 1967; Couderec *et al.*, 1969; Cazal *et al.*, 1971; Quattrin *et al.*, 1972). Cette surcharge est parfois rapportée au cours d'affections caractérisées par la perturbation des lipides sériques. Il s'agit d'hyperlipoprotéïnémie (Roberts *et al.*, 1970), de type 1 (Ferrans *et al.*, 1971) ou 5 (Rywlin *et al.*, 1971), de dyslipidoses (Terry *et al.*, 1954; Kristenson, 1966; Lowden *et al.*, 1970), d'albinisme avec cholestérol sérique bas (Maranoff *et al.*, 1972) ou de déficiences en cholestérol acyltransférase (Jacobsen *et al.*, 1972). Enfin, des observations ont été rapportées au cours d'une granulomatose chronique (Ford *et al.*, 1962; Bartman *et al.*, 1967), à l'occasion d'une rupture de rate (Winkler *et al.*, 1969), chez des enfants d'une même fratrie (Jones *et al.*, 1970; Lake *et al.*, 1970).

A côté de ces différentes affections, il existe un certain nombre de cas dans lesquels n'apparaît aucune cause à l'existence d'une telle surcharge. Silverstein *et al.* (1970, 1972) en ont réuni un certain nombre sous le nom de syndrome des histiocytes bleu marine. Ces malades ont en particulier une modification présente dans notre cas. Ils ont une élimination urinaire augmentée des muco-polysaccharides.

La place nosologique de ce syndrome des histiocytes bleu marine n'apparaît pas encore clairement ni même sa signification physiopathologique. Deux hypothèses peuvent être faites.

Il pourrait s'agir d'une phagocytose excessive de cellules sanguines par les macrophages professionnels. Cette activité exagérée dépassant leur possibilité de dégradation. Ainsi s'expliquerait l'accumulation de certains produits de dégradation incomplètement métabolisés aboutissant aux aspects morphologiques décrits. Cette phagocytose excessive pourrait représenter soit la phagocytose de cellules sanguines reconnues comme anormales par les histiocytes, soit la phagocytose de cellules normales secondaire à une hyperplasie histiocyttaire cryptogénétique.

Dans une deuxième hypothèse, il s'agirait d'histiocytes présentant une phagocytose normale mais une digestion anormale. Cette dernière pourrait être liée à un déficit enzymatique ne permettant pas une dégradation complète des substances phagocytées. Le syndrome des histiocytes bleu marine correspondrait alors à la définition des maladies lysosomiales.

Bibliographie

- Bartman, J., Velde, R. L. van de, Friedman, F.: Pigmented lipid histiocytosis and susceptibility to infection: ultrastructure of splenic histiocytes. *Pediatrics* **40**, 1000-1002 (1967)
- Biava, C.: Electron microscopic studies on periodic acid-Schiff-positive non glycogénic structure in human liver cells. *Amer. J. Path.* **46**, 435-465 (1965)
- Cazal, P., Karn, P., Emberger, J. M., Navarro, M., Rizkalla, N.: Splénomégalie à céroïdes (syndrome des histiocytes «bleus»). *Ann. Anat. path.* **16** (4), 405-416 (1971)
- Couderec, P., Dufour, H., Faure, H., Martin, H.: L'histiocytose lipidique de la rate au cours du purpura thrombopénique idiopathique. *Ann. Anat. path.* (Paris) **14**, 309-317 (1969)
- Diebold, J., Bernadou, A., Kalifat, R., Ganter, P., Reynes, M.: Lipidose splénique avec histiocytes «bleu marine» par accumulation de céroïdes. *Nle. Pres. Méd.* **1**, (30), 1983-1988 (1972)
- Dollberg, L., Casper, J., Djaldetti, M., Klibansky, C., Vries, A. de: Lipid laden histiocytes in the spleen in thrombocytopenic purpura. *Amer. J. clin. Path.* **43**, 16-25 (1965)
- Dosik, H., Rosner, F., Sawitsky, A.: Acquired lipidosis: Gaucher-like cell and "blue-cells" in chronic granulocytic leukemia. *Sem Hematol.* **9** (3), 309-316 (1972)
- Ferrans, V. J., Buja, M., Roberts, W., Fredrickson, D. S.: The spleen in type I hyperlipoprotéinemia. Histochemical, biochemical, microfluorometric and electron microscopic observations. *Amer. J. Path.* **64**, 67-96 (1971)
- Ford, D. K., Price, G. E., Culling, C. F. A., Vassar, P. S.: Familial lipochrome pigmentation of histiocytes with hyperglobulinemia pulmonary infiltration, splenomegaly, arthritis and susceptibility to infection. *Amer. J. Med.* **33**, 478-489 (1962)
- Gyorkey, F., Shimamura, T., O'Neal, R. M.: The fine structure of ceroid in human atheroma. *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 732-736 (1967)
- Hartroft, W. C., Porta, E. A.: Ceroid. *Amer. J. Med. Sci.* **250**, 324-345 (1965)
- Hill, J. M., Speer, R. J., Gedrikoglu, H.: Secondary lipidosis of spleen associated with thrombocytopenia and other blood dyscrasias treated with steroids. *Amer. J. clin. Path.* **39**, 607-615 (1963)
- Howes, E. L., Price, H. M., Blumberg, J. M.: The effects of a diet producing lipochrome pigment (ceroid) on the ultrastructure of skeletal muscle in the rat. *Amer. J. Path.* **45**, 599-631 (1964)
- Jacobsen, C. D., Gjone, E., Hovig, T.: Sea-blue histiocyte in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. *Scand. J. Haemat.* **9**, 106-113 (1972)
- Jones, B., Gilbert, E. F., Zugibe, F. T., Thompson, H.: Sea blue histiocytes disease in siblings. *Lancet* **1970 II**, 73-75
- Kattlove, H. E., Williams, J. C., Gaynor, E., Spivack, M., Bradley, R. M., Brady, R. O.: Gaucher cells in chronic myelocytic leukemia: an acquired abnormality. *Blood* **33**, 379-390 (1969)

- Kristenson, K., Sourander, P.: Occurrence of lipofuscin in inherited metabolic disorders affecting the nervous system. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **29**, 113–118 (1966)
- Landing, B. H., Strauss, L., Crocker, A. C., Braustein, H., Henley, W. L., Will, J. R., Sanders, M.: Thrombocytopenic purpura with histiocyte of the spleen. *New Engl. J. Med.* **265**, 572–577 (1961)
- Lake, B. D., Stephens, R., Stephens, N.: Syndrome of the sea blue histiocyte (letter to the editor). *Lancet* **1970 II**, 304–309
- Lee, R. E., Ellis, L. D.: The storage cells of chronic myelogenous leukemia. *Lab. Invest.* **24**, (4), 261–264 (1971)
- Lowden, J. A., Barson, A. J., Wentnorth, P.: Wolman's disease: a microscopic and biochemical study showing accumulation of ceroid and esterified cholesterol. *Canad. med. Ass. J.* **102**, 402–405 (1970)
- Maranoff, R., Fite, F. K., Frumin, A. M.: Greenish blue granular marrow histiocyte associated with low serum cholesterol. *Amer. J. clin. Path.* **57** (1), 103–105 (1972)
- Moeschlin, S.: Spleen puncture, p. 24–25. New York: Grune & Stratton 1951
- Pappenheimer, A. M., Victor, J. MD.: Ceroid pigment in human tissues. *Amer. J. Path.* **22**, 395–413 (1946)
- Pearse, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*, 2nd ed. Boston: Little Brown 1960
- Porta, E. A., Hartroft, N. S.: Lipid pigments in relation to aging and dietary factor (lipofuscin). In: Wolman M. (ed.), *Pigments in pathology*, p. 191–223. New York and London: Academic 1969
- Quattrin, N., Di Girolamo, R., Mastrobuoni, A., Montuori, R.: Una nuova malattia emorragica trombocitopenia: la «istiocitosi blu-mare». *Minerva med.* **63**, 1396–1404 (1972)
- Quinton, S. W.: Histiocytosis of spleen, lymph node, and bone marrow. Associated with thrombocytopenia, splenomegaly, and splenic angiomata. *Amer. J. clin. Path.* **47**, 484–489 (1967)
- Roberts, W. C., Levy, R. I., Fredrickson, D. S.: Hyperlipoproteinemia. A review of the fine types first reports of necropsy findings in type 3. *Arch. Path.* **90**, 46–56 (1970)
- Rywin, A. M., Hernandez, J. A., Chastain, D. E., Pardo, V.: Ceroid histiocytes of spleen and bone marrow in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). A contribution to the understanding of the sea blue histiocyte. *Blood* **37** (5), 587–593 (1971)
- Rywin, A. M., Lopez-Gomez, A., Tachmes, P., Pardo, V.: Ceroid histiocytosis of the spleen in hyperlipemia. *Amer. J. clin. Path.* **56** (5), 572–579 (1971)
- Saltzstein, S. L.: Phospholipid accumulation in histiocyte of splenic pulp associated with thrombocytopenic purpura. *Blood* **18**, 73–88 (1961)
- Samorajski, T., Orda, J. M., Keef: The fine structure of lipofuscin age in the nervous system of aged mice. *J. Cell Biol.* **26**, 779–795 (1965)
- Silverstein, M. N., Ellefson, R. D.: The syndrome of the sea blue histiocyte. *Sem. in Hematol.* **9** (3), 299–307 (1972)
- Silverstein, M. N., Ellefson, R. D., Ahern, E. J.: The syndrome of the sea blue histiocyte. *New Engl. J. Med.* **282**, 1–4 (1970)
- Sundberg, R. D., Nelson, D. A., Hoilund, L. J., Herbst, G. H., Beecher, N. B.: Cell debris and blue pigment macrophages in chronic myelogenous leukemia. Abstract A, 37 Xth. Congress International Society of Hematology Stockholm, 1964
- Terry, R. D., Sperry, W. H., Proloff, B.: Adnet lipidosis resembling Niemann-Pick's disease. *Amer. J. Path.* **30**, 263–285 (1954)
- Winkler, H. H., Frame, B., Saeed, S. M., Spindler, A. C., Brouillette, J. N.: Ceroid storage disease complicated by rupture of the spleen. *Amer. J. Med.* **46**, 297–301 (1969)

Dr. M. Reynés
Hôtel-Dieu
1 Place du Paris Notre Dame
F-75181 Paris Cedex 04
France