

## Déficit en alpha-1-antitrypsine chez l'enfant

### Ultrastructure du foie et spéculations

Jacques M. Scotto, Hélène G. Stralin et Daniel Alagille

Unité d'Hépatologie Infantile, U 56 de l'I.N.S.E.R.M., Hôpital de Bicêtre,  
Le Kremlin-Bicêtre

Reçu le 26 juin 1975

### Alpha-1-Antitrypsin Deficiency in Children

#### Liver Ultrastructure and Speculations

*Summary.* Fourteen liver biopsies from twelve young patients with liver diseases associated with homozygous, PiZZ phenotype, alpha-1-antitrypsin deficiency in their sera were examined by electron microscopy.

In all these biopsies characteristic homogeneous material was found in some hepatocytes and corresponded, when observed on adjacent semithin sections by light microscopy, to the deposit stained by periodic acid Schiff reaction. The accumulation in perinuclear spaces resulted in intranuclear invaginations, but the major deposit was located in lumens of the endoplasmic reticulum. The limiting membranes were rough and smooth but the extent of the latter was so large that only this type of reticulum seemed peculiarly involved in the accumulating process.

On the contrary, Golgi complexes did not seem obligatorily involved by this process because, when observed, they appeared almost normal even in heavily overloaded liver cells.

At least for the PiZZ phenotype, the abnormal substance would be an asialo form of normal alpha-1-antitrypsin. Thus the subject of this study is the morphologic translation of an impairment in the synthesis of a glycoprotein.

In the light of data concerning the synthesis of such proteins our findings lead us to suggest:

The ultrastructural patterns observed in alpha-1-antitrypsin deficiency cannot give the expected morphologic evidence of the biochemical data which locate the first binding steps of monosaccharide residues in the rough endoplasmic reticulum.

The absence of sialic acid could not result from an enzymatic defect primarily located in Golgi complexes but could be secondary to an impairment in the binding of one monosaccharide residue which improves subsequent fixation of sialic acid, in the smooth endoplasmic reticulum.

Finally it seems necessary to emphasize that the relationship between the abnormal substance and various important non specific lesions is largely unknown and that we don't know the significance of polymorphous dense bodies observed in ductular cells during the cholestatic period.

*Key words:* Alpha-1-antitrypsin deficiency — Liver — Electron microscopy — Endoplasmic reticulum.

### Introduction

Certains sujets dont le sérum ne contient que des taux très bas d'alpha-1-antitrypsine, puissant inhibiteur des protéases, sont considérés comme déficitaires.

Il a été établi que ce déficit s'accompagne souvent, à l'âge adulte, d'un emphysème pulmonaire associé ou non à une atteinte hépatique (Eriksson, 1964). Chez l'enfant, presque uniquement des affections hépatiques paraissent liées à ce déficit (Sharp *et al.*, 1969).

Dans certains hépatocytes de nombreux sujets déficitaires on peut observer, en microscopie optique, une substance anormale fortement colorée par la technique du PAS, même après traitement par l'alpha-amylase.

En microscopie électronique ce matériel anormal est localisé dans des lumières du réticulum endoplasmique.

Des études immunologiques ont montré qu'au minimum pour le phénotype Pi ZZ, la substance anormale possède l'antigénicité de l'alpha-1-antitrypsine (Sharp, 1971; Berg et Eriksson, 1972; Lieberman *et al.*, 1972; Palmer *et al.*, 1973; Cutz *et al.*, 1974; Feldmann *et al.*, 1974). Elle correspondrait biochimiquement à une variante, dépourvue d'acide sialique terminal, de cette glycoprotéine (Eriksson et Larsson, 1975). L'anomalie concernerait donc la synthèse d'une glycoprotéine particulière.

Il est établi que le lieu de synthèse des glycoprotéines normales est le réticulum endoplasmique mais quelques divergences subsistent entre biochimistes et morphologistes sur la participation du réticulum endoplasmique granulaire dans l'accrochage de résidus monosaccharidiques (Carasso *et al.*, 1970; Ovtracht et Thierry, 1972; Redman et Cherian, 1972). En conséquence notre étude ultrastructurale a essentiellement porté sur les aspects du réticulum endoplasmique en relation avec le processus d'accumulation de substance anormale.

### Matériel clinique et méthodes

Quatorze ponction-biopsies du foie furent pratiquées chez douze enfants atteints d'une affection hépatique associée à un déficit sérique en alpha-1-antitrypsine.

Les phénotypes Pi furent établis selon les méthodes préconisées par Laurell et Eriksson (1963), Fagerhol et Brand (1965) et Fagerhol et Laurell (1967). Le pouvoir inhibiteur du sérum vis à vis de la trypsine fut mesuré avec la technique de Bieth *et al.* (1969) et la concentration sérique en alpha-1-antitrypsine fut appréciée par la méthode de Mancini *et al.* (1965).

Pour la microscopie électronique les prélèvements hépatiques furent fixés par le glutaraldéhyde à 2,5% dans le tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) pendant 1 heure et/ou par l'acide osmique à 1% dans le même tampon pour la même durée. Ils furent déshydratés dans des solutions d'alcool éthylique à concentrations croissantes puis dans le propylène et inclus dans l'Epon 812. Les coupes ultrafines, contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, furent examinées au microscope électronique Elmiskop 101 Siemens.

Pour la microscopie optique, des coupes semi-fines, de 0,5 à 1  $\mu$ m d'épaisseur, furent colorées par la méthode du PAS après avoir enlevé la résine selon la méthode de Lane et Europa (1965).

### Résultats

Différentes données cliniques et biologiques sont résumées pour chaque malade dans le tableau 1. Tous les sujets sont de phénotype Pi ZZ.

Tous les prélèvements hépatiques contenaient de la substance anormale dans certains hépatocytes. Cette substance, colorée par le PAS sur les coupes semi-fines vue en microscopie optique, correspond sur les coupes ultrafines destinées à la microscopie électronique à un matériel modérément dense, homogène à faible grossissement, finement fibrillaire à plus fort (fig. 1). Ce matériel est contenu dans des citernes du réticulum endoplasmique qu'il distend et dont il épouse généralement les contours. La surface des membranes limitant les zones d'accumulation paraît essentiellement lisse malgré la présence en quelques endroits

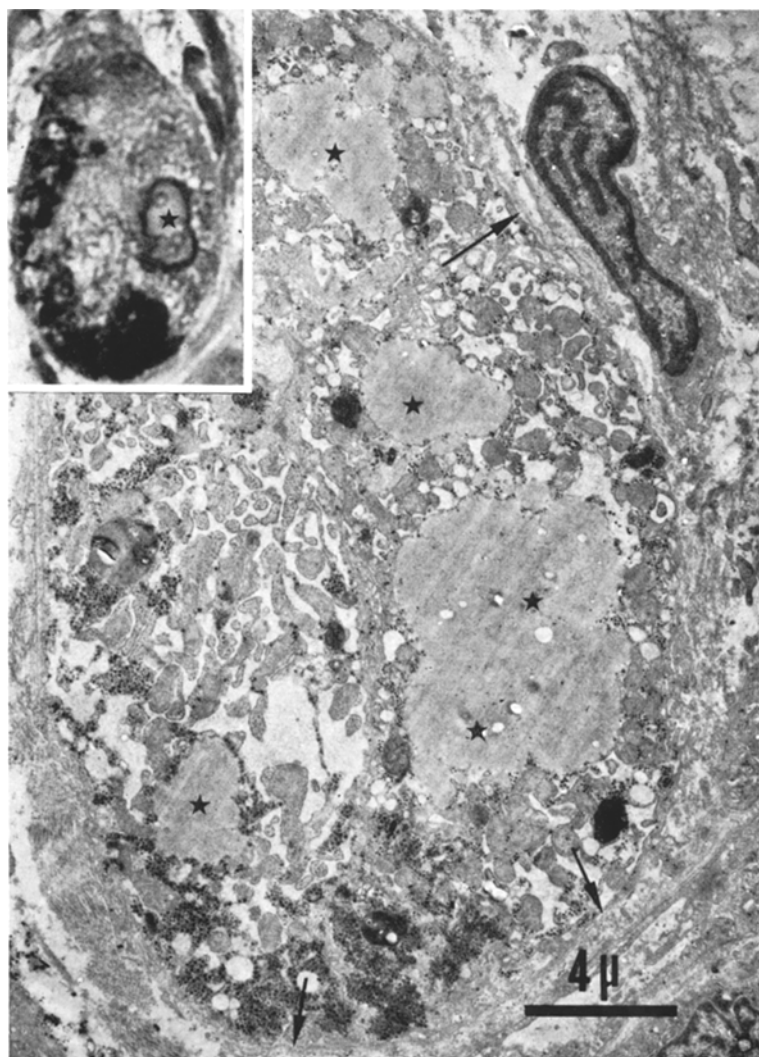


Fig. 1. La substance anormale (\*) apparaît, en microscopie optique, sous forme de globules colorés par le PAS (encart) et correspond, en microscopie électronique, à un matériel homogène situé dans des citernes dilatées du réticulum endoplasmique. Ici une fine membrane basale (flèche) sépare cet hépatocyte de la fibrose

de rares petits groupements ribosomiques (fig. 2). La dilatation du réticulum déborde les zones de stockage et concerne alors le réticulum aussi bien lisse que granulaire; sa lumière, généralement vide, peut parfois contenir un matériel grossièrement fibrillaire (fig. 2 et 3).

Les quelques appareils de Golgi observés avaient un aspect presque normal sans grande dilatation ni accumulation de substance anormale, même dans des hépatocytes où le stockage était ailleurs très important (fig. 4).

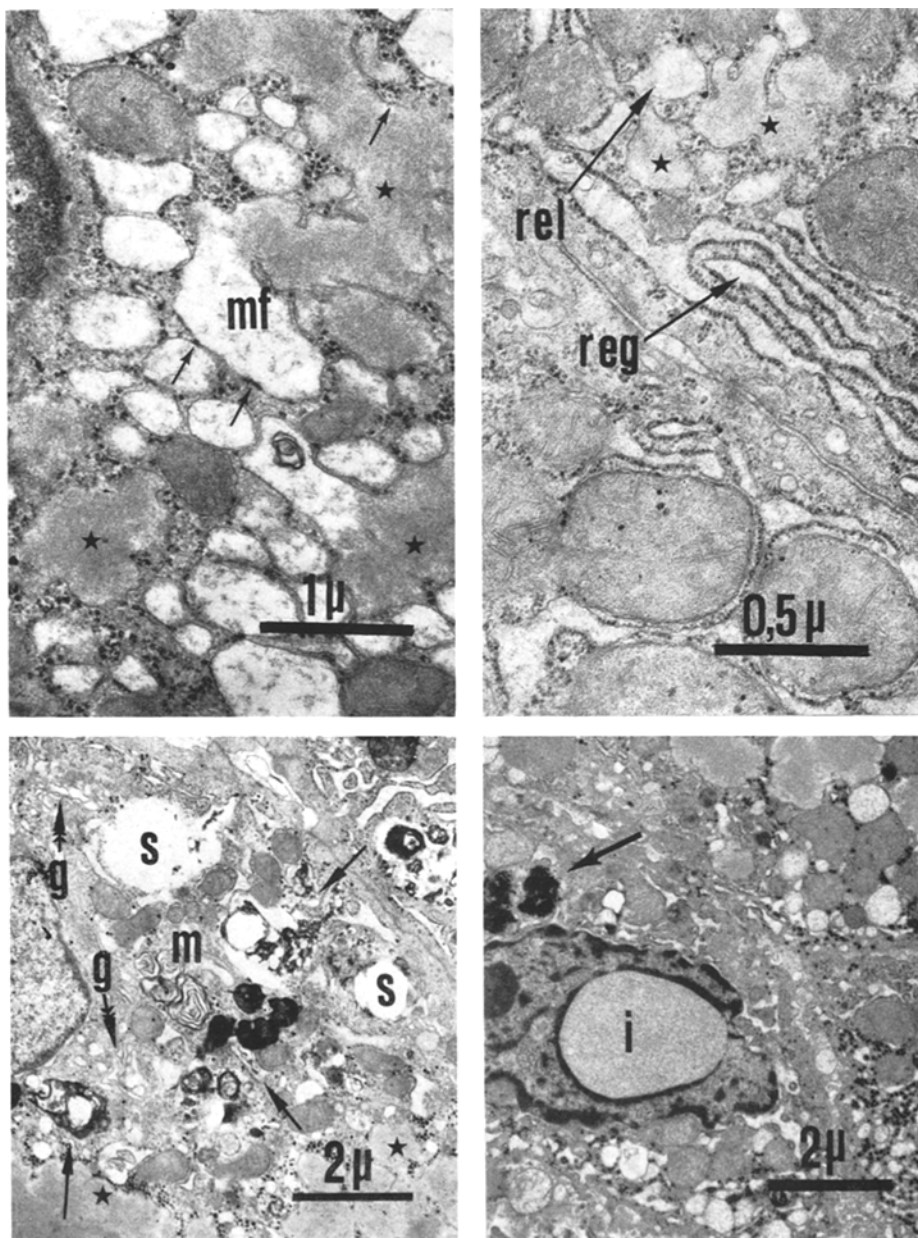


Fig. 2. La plus grande partie de la surface des membranes limitant les dépôts (★) est lisse. Cependant quelques rares ribosomes attachés (flèche) définissent de petites portions granulaires en regard desquelles la lumière est occupée par un matériel plus volontier fibrillaire (*mf*) qu'homogène

Fig. 3. En dehors des zones de dépôt (★) le réticulum endoplasmique est également souvent dilaté mais la distinction entre sa variété granulaire (*reg*) et lisse (*rel*) n'offre généralement aucune difficulté

Tableau 1

Cas	Age au moment de la biopsie	Sexe	P.I.T. (1)	A.1.A.T. (2)	Ictère		H.T.P. (3)	Recul
					Début	Fin		
1	3 m.	♀	0,60	43	3 <sup>e</sup> j.	12 <sup>e</sup> s.	—	6 m.
2	11 a.	♂	0,31	57	10 <sup>e</sup> s.	11 <sup>e</sup> a.	+	12 a.
3	8 m.	♂	0,66	80	2 <sup>e</sup> j.	12 <sup>e</sup> s.	—	8 m.
4	1 <sup>ère</sup> biop.	♂	0,27	80	2 <sup>e</sup> j.	32 <sup>e</sup> s.	—	24 m.
	2 <sup>ème</sup> biop.							
5	6 a. 9 m.	♀	0,60	60	2 <sup>e</sup> j.	40 <sup>e</sup> s.	+	7 a. 5 m.
6	11 m.	♂	0,36	50	3 <sup>e</sup> j.	10 <sup>e</sup> s.	—	20 m.
7	16 m.	♀	0,35	102	2 <sup>e</sup> s.	40 <sup>e</sup> s.	—	29 m.
8	7 m.	♂	0,56	60	6 <sup>e</sup> s.	26 <sup>e</sup> s.	—	19 m.
9	2 m.	♂	0,68	55	14 <sup>e</sup> j.	10 <sup>e</sup> s.	—	6 m.
10	3 m.	♂	0,45	76	10 <sup>e</sup> j.	56 <sup>e</sup> s.	—	14 m.
11	28 m.	♀	0,72	68	2 <sup>e</sup> j.	56 <sup>e</sup> s.	+	36 m.
12	1 <sup>ère</sup> biop.	♂	0,67	76	3 <sup>e</sup> j.	6 <sup>e</sup> j.	—	7 m.
	2 <sup>ème</sup> biop.				6 <sup>e</sup> s.	14 <sup>e</sup> s.		

(1) P.I.T. = Pouvoir inhibiteur de la trypsine. Normale:  $1,89 \pm 0,60$  U/ml.

(2) A.1.A.T. = Concentration en alpha-1-antitrypsine. Normale:  $300 \pm 100$  mg/100 ml.

(3) H.T.P. = Hypertension portale.

Des invaginations intranucléaires contenant un matériel homogène moins dense mais également coloré par le PAS en microscopie optique, ont été notées dans quelques cas (fig. 5).

A côté du dépôt de substance anormale des lésions aspécifiques intenses et étendues sont à signaler: tout d'abord une importante stéatose, puis à un moindre degré diverses lésions membranaires et divers corps denses polymorphes (fig. 4). Ces altérations touchent aussi bien des hépatocytes surchargés que d'autres. Dans sept de nos cas des ductules ou des jonctions canaliculo-ductulaires ont été concernés par les coupes. Chez cinq d'entre eux, les seuls ponctionnés en période choléstatique, de nombreux gros amas de structure polymorphe occupaient le cytoplasme d'un grand nombre de cellules ductulaires (fig. 6).

Fig. 4. Alors que les complexes de Golgi n'apparaissent pas très modifiés ( $g \rightarrow$ ) le cytoplasme de cet hépatocyte qui contient de la substance anormale (★) est le siège de lésions non spécifiques: stéatose (S), corps denses hétérogènes et vacuolaires (flèches), figures pseudo-myéliniques (m)

Fig. 5. Quelques invaginations intranucléaires (i) sont parfois rencontrées. Noter ici un corps dense hétérogène dans le cytoplasme (flèche)

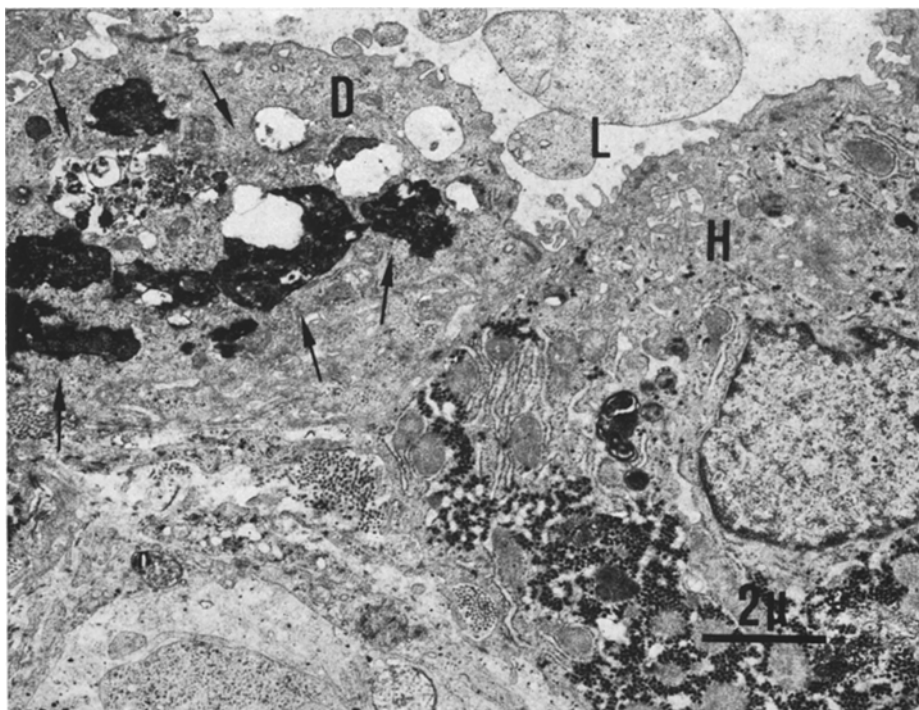


Fig. 6. Jonction canaliculo-ductulaire dont la lumière (L) est bordée par des hépatocytes (H) et des cellules ductulaires (D). Ces dernières contiennent souvent, à la période cholestatique, de nombreux corps polymorphes, denses et vacuolaires (flèches)

### Discussion

Notre étude ultrastructurale confirme que dans certains hépatocytes d'enfants ayant une maladie hépatique associée à un déficit sérique en alpha-1-antitrypsine de phénotype PiZZ, s'accumule une substance homogène caractéristique sinon pathognomonique. Cette substance correspond sur les coupes semi-fines adjacente à celle colorée par le PAS en microscopie optique.

Elle est contenue dans la lumière du réticulum endoplasmique. La présence de quelques petits groupements de ribosomes attachés aux membranes de ce réticulum signe la nature granulaire de ce réticulum au niveau de ces groupements. Cependant, contrairement à la majorité des observateurs (Sharp *et al.*, 1969; Berg et Eriksson, 1972; Campa *et al.*, 1973; Cohen *et al.*, 1973; Hug, 1973; Cutz *et al.*, 1974) à l'exception de Glasgow *et al.* (1973), il nous paraît important de souligner qu'en raison de la pauvreté et de la rareté de tels groupements ribosomiques il ne semble pas que le réticulum endoplasmique granulaire participe activement au processus d'accumulation.

Les deux réticulum étant en continuité, la forte accumulation au niveau du type lisse pourrait déborder en regard du type granulaire et il en serait de même dans la localisation périnucléaire aboutissant à la formation des invaginations intranucléaires signalées. On ne peut donc pas trouver ici la preuve morphologique

attendue par certains biochimistes qui ont établi que la première étape d'accrochage des résidus monosaccharidiques des glycoprotéines se situerait au niveau du réticulum endoplasmique granulaire (Redman et Cherian, 1972).

Cox (1973) a avancé l'hypothèse que, pour le phénotype Pi ZZ, l'absence d'acide sialique serait à l'origine du processus d'accumulation intrahépatocytaire. L'accrochage de cet acide a normalement lieu au niveau de l'appareil de Golgi. Dans notre matériel cette organelle cellulaire avait un aspect sensiblement normal même dans des hépatocytes fortement surchargés par ailleurs. Leur rôle dans le processus de stockage ne semble donc pas primordial et seule une anomalie dans la fixation d'un résidu monosaccharidique au niveau du réticulum endoplasmique pourrait expliquer un défaut d'accrochage ultérieur d'acide sialique sans participation directe des complexes golgiens. L'absence de sialyltransférase sérique constatée par Kuhlenschmidt *et al.* (1974) chez un sujet déficitaire de phénotype Pi ZZ pourrait alors s'expliquer par une répression de sa synthèse résultant de sa non-utilisation.

De façon plus générale la diversité des phénotypes Pi du système alpha-1-antitrypsinique, observée chez des sujets déficitaires ou apparemment normaux, pourrait découler de différences portant sur la qualité du résidu monosaccharidique et/ou sur le mode de sa fixation, l'accumulation intrahépatocytaire de substance anormale ne survenant que dans les cas d'impossibilité ultérieure d'un couplage avec l'acide sialique.

La genèse des lésions non spécifiques rencontrées chez les malades atteints de troubles hépatiques reste inexpiquée.

Nous ignorons de même quelle signification ont les modifications que nous avons constaté, uniquement en période cholestatique chez des enfants âgés de moins de six mois, dans de nombreuses cellules ductulaires. En effet, des modifications identiques ont été considérées comme pathologiques chez l'adulte (Chedid *et al.*, 1974) alors que chez l'enfant elles ont été signalées aussi bien dans des cas d'atrésie des voies biliaires extrahépatiques (Hollander et Schaffner, 1969) que chez des nouveaux-nés exempts de toute affection hépatique ou biliaire (Goldfisher et Bernstein, 1969).

*Résumé.* Quatorze biopsies hépatiques chez douze enfants atteints d'une maladie hépatique associée à un déficit sérique en alpha-1-antitrypsine de phénotype PiZZ ont été examinées en microscopie électronique.

Dans tous ces prélèvements existaient des hépatocytes contenant dans des citernes du réticulum endoplasmique un matériel homogène qui correspondait, sur les coupes semi-fines adjacentes vues en microscopie optique, aux globules colorés par la réaction du PAS.

Le même matériel était parfois visible sous forme d'invaginations intranucléaires résultant vraisemblablement d'un dépôt dans des espaces périnucléaires.

Malgré cette localisation qui appartient aux deux types de réticulum endoplasmique, malgré quelques rares groupements ribosomiques accrochés aux membranes limitant les autres aires d'accumulation, l'étendue des surfaces lisses bordant ces aires est si vaste que seul le réticulum endoplasmique lisse nous paraît directement impliqué dans le processus de dépôt.

Par contre les appareils de Golgi ne nous ont pas paru obligatoirement concernés par ce processus car chaque fois qu'ils furent repérés ils apparaissaient sensiblement normaux même dans des hépatocytes fortement surchargés par ailleurs.

Il a été montré que la substance anormale correspondait, au moins pour le phénotype PiZZ, à une variante, dépourvue d'acide sialique, de l'alpha-1-antitrypsine normale.

Nous sommes donc en présence dans notre matériel de la traduction morphologique d'un trouble touchant la synthèse d'une glycoprotéine.

A la lumière des données actuelles concernant la synthèse de ce type de protéines nos constatations nous amènent à formuler les propositions suivantes:

Les aspects ultrastructuraux observés dans les déficits en alpha-1-antitrypsine ne peuvent apporter la preuve morphologique attendue qui corroborerait les travaux biochimique situant les premières étapes d'accrochage des résidus monosaccharidiques au niveau du réticulum endoplasmique granulaire.

L'absence d'acide sialique pourrait ne pas résulter d'une carence enzymatique initialement localisées dans l'appareil de Golgi mais être secondaire à un trouble concernant la fixation, dans le réticulum endoplasmique lisse, d'un des résidus monosaccharidiques empêchant l'accrochage ultérieur de l'acide sialique.

Il nous paraît nécessaire enfin de souligner notre ignorance sur le rôle que joue la substance anormale dans la constitution des importantes lésions aspécifiques touchant de nombreux hépatocytes et sur la signification des corps denses polymorphes que nous avons rencontrés dans des cellules ductulaires en période choléstatique.

### Bibliographie

- Berg, N. O., Eriksson, S.: Liver disease in adults with alpha-1-antitrypsin deficiency. *New Engl. J. Med.* **287**, 1264-1267 (1972)
- Bieth, J., Metais, P., Warter, J.: Détermination de la capacité trypsique et chymotrypsique du sérum humain normal. *Enzym. biol. clin.* **10**, 243-257 (1969)
- Campra, J. L., Craig, J. R., Peters, R. L., Reynolds, T. B.: Cirrhosis associated with partial deficiency of alpha-1-antitrypsin in an adult. *Ann. Intern. Med.* **78**, 223-238 (1973)
- Carasso, N., Thierry, J. P., Favard, P.: Mise en évidence par méthode cytochimique de glycoprotéines dans diverses structures (dont le réticulum endoplasmique) d'un cilié péritriche. *J. Microscopie* **9**, 201-220 (1970)
- Castleman, B., Scully, R. E., McNeely, B. U.: Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 41-1972. **287**, 763-768 (1972)
- Chedid, A., Spellberg, M. A., De Beer, R. A.: Ultrastructural aspects of primary biliary cirrhosis and other types of cholestatic liver disease. *Gastroenterology* **67**, 858-869 (1974)
- Cohen, K. L., Rubin, R. E., Echevarria, P. A., Sharp, H. L., Teague, P. O.: Alpha-1-antitrypsin deficiency, emphysema and cirrhosis in adult. *Ann. Intern. Med.* **78**, 227-232 (1973)
- Cox, D. W.: Defect in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Lancet* **II**, 844-845 (1973)
- Cutz, E., Moroz, P., Balfe, J. W., Sass-Kortsak, A.: Glomerulonephritis in patient with cirrhosis of liver associated with alpha-1-antitrypsin (A1AT) deficiency. *Amer. J. Path.* **74**, 12a (1974)
- De Lellis, R. A., Balog, K., Merk, F. B., Chirife, A. M.: Distinctive hepatic cell globules in adult alpha-1-antitrypsin deficiency. A histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Arch. Path.* **94**, 308-316 (1972)
- Eriksson, S.: Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Acta med. scand.* **175**, 197-205 (1964)
- Eriksson, S., Larsson, C.: Purification and partial characterisation of PAS-positive inclusion bodies from the liver in alpha-1-antitrypsin deficiency. *New Engl. J. Med.* **292**, 176-180 (1975)
- Fagerhol, M. K., Braend, M.: Serum pre-albumin: polymorphism in man. *Science* **149**, 986-987 (1965)
- Fagerhol, M. K., Laurell, C. B.: The dysmorphism of "prealbumins" and alpha-1-antitrypsin in human sera. *Clin. chim. Acta* **16**, 199-203 (1967)
- Feldmann, G., Bignon, J., Chahinian, P., Degott, Cl., Benhamou, J. P.: Hépatocyte ultrastructural changes in  $\alpha 1$  antitrypsin deficiency. *Gastroenterology* **67**, 1214-1224 (1974)
- Glasgow, J. F. T., Lynch, M. J., Hercz, A., Levison, H., Sass-Kortsak, A.: Alpha-1-antitrypsin deficiency in association with both cirrhosis and chronic obstructive lung disease in two sibs. *Amer. J. Med.* **58**, 181-194 (1973)



- Goldfisher, F., Bernstein, J.: Lipofuscin ageing pigments granules of the newborn human liver. *J. Cell. Biol.* **42**, 253-261 (1969)
- Gordon, H. W., Dixon, J., Rogers, J. C., Mittman, C., Lieberman, J.: Alpha-1-antitrypsin (A1AT) accumulation in livers of emphysematous patients with A1AT deficiency. *Human Path.* **3**, 361-370 (1972)
- Hollander, M., Schaffner, F.: Electron microscopic studies in biliary atresia. I. Bile ductular proliferation. *Amer. J. Dis. Child.* **116**, 49-56 (1968)
- Hug, G.: Non bilirubin genetic disorders of the liver. In: *The liver*. p. 45 ed. par Gall E. A., Mostofi F. K. Baltimore: Williams and Wilkins Publ. 1973
- Ishak, K. G., Jenis, E. H., Marshall, M. L., Bolton, P. H., Battistone, G. C.: Cirrhosis of the liver associated with alpha-1-antitrypsin deficiency. *Arch. Path.* **94**, 445-455 (1972)
- Kuhlen Schmidt, M. S., Yunis, E. J., Iammarino, R. M., Turco, S. J., Peters, S. P., Glew, R. H.: Demonstration of sialyl-transferase deficiency in the serum of a patient with  $\alpha$ 1 antitrypsin deficiency and hepatic cirrhosis. *Lab. Invest.* **31**, 413-419 (1974)
- Lane, B. P., Europa, D. L.: Differential staining of ultrathin sections of epon-embedded tissues for light microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **13**, 579-582 (1965)
- Laurell, C. B., Eriksson, S.: The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **15**, 132-140 (1963)
- Lieberman, J., Mittman, C., Gordon, H. W.: Alpha-1-antitrypsin in the livers of patients with emphysema. *Science* **175**, 63-65 (1972)
- Mancini, G., Carbonara, A. O., Heremans, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radical immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**, 235-254 (1965)
- Ovtracht, L., Thierry, J. P.: Mise en évidence par cytochimie ultrastructurale de compartiments physiologiquement différents dans un même saccule golgien. *J. Microscopie* **15**, 135-170 (1972)
- Palmer, P. E., Wolfe, H. J., Gherardi, G. J.: Hepatic changes in adult  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Gastroenterology* **65**, 284-293 (1973)
- Redman, C. M., Cherian, G.: The secretory pathways of rat serum glycoproteins and albumin. Localization of newly formed proteins within the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **52**, 232-245 (1972)
- Sharp, H. L.: Alpha-1-antitrypsin deficiency. *Hosp. Pract.* **6**, 83-96 (1971)
- Sharp, H. L., Bridges, R. E., Krivit, W., Frier, E.: Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. *J. Lab. clin. Med.* **73**, 934-939 (1969)

Dr. Jacques Scotto  
U 56 I.N.S.E.R.M.  
Hôpital de Bicêtre  
F-94270 Le Kremlin Bicêtre  
France