

*ÉTUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DE JONCTIONS
NEUROMUSCULAIRES DU CRABE BLEU, ("CALLINECTES
DANAE", SMITH) **

par ROGER LAVALLARD

Département de Physiologie Générale et Animale,
et Section de Microscopie Electronique de l'Uni-
versité de São Paulo.

SÃO PAULO — BRÉSIL

(7 Planches)

INTRODUCTION

L'utilisation du microscope électronique pour observer l'ultrastructure de la jonction neuromusculaire, entreprise pour la première fois par BEAMS et EVAN (1), fut d'abord consacrée au cas de la plaque motrice des Vertébrés. Une série de travaux (2, 3, 4, 5), effectués avec des techniques en cours de développement, est bientôt suivie par l'importante publication de ROBERTSON (6) sur la jonction myoneurale d'un Reptile, et par le travail de REGER (7) sur le gastrocnémien de la Souris. Des jonctions neuromusculaires d'Invertébrés sont à leur tour examinées en microscopie électronique par EDWARDS, RUSKA et DE HARVEN (8, 9) qui ont choisi des muscles d'Insectes.

Dans le cas des Vertébrés, grâce à l'utilisation de méthodes plus fines que les imprégnations argentiques, comme les colorations post-vitales au vert Janus ou au violet de méthyle (10), comme les localisations histochimiques de la cholinestérase (11), la cytologie avait mis en évidence des caractères essentiels de la jonction neuromusculaire: nature épilemmale de la terminaison nerveuse, existence de l'appareil sous-neural. Dans le cas des Arthropodes, la plupart des connaissances a été obtenu avec des imprégnations argentiques, en général de moins bon rendement que chez les Vertébrés, ou avec le

(*) Reçu pour publication: Avril 1960.

bleu de méthylène en colorations post-vitales, ce qui permet surtout des observations topographiques de l'innervation. Il en résulte, pour les Crustacés, des données fragmentaires, souvent contradictoires, sur l'existence de plaques motrices (18), sur le nombre de jonctions myoneurales par fibre musculaire (12, 13), sur la position épi- ou hypo-lemmale des terminaisons nerveuses par rapport au sarcolemme (17, 18).

Comme le démontrent les deux premiers travaux (8, 9) déjà publiés dans ce domaine pour les Insectes¹, le microscope électronique semble être un instrument favorable d'informations sur les structures des jonctions myoneurales des Arthropodes, à propos desquelles les techniques de la cytologie classique n'ont pas été jusqu'à présent très fructueuses.

Cette publication rapporte les premières observations de zones de jonctions neuromusculaires que nous avons rencontrées au cours d'une étude de muscles de Crustacés en microscopie électronique. En plus de quelques données sur la structure des nerfs périphériques, des renseignements sont apportés sur la morphologie d'ensemble de jonctions myoneurales du Crabe Bleu, sur la disposition des gaines du nerf, des membranes basales, de l'axolemme et du sarcolemme au niveau de cette jonction, sur l'ultrastructure de l'axoplasme et du sarcoplasme terminaux.

MATERIEL ET METHODES

Les muscles utilisés proviennent des pièces buccales du Crabe Bleu (*Callinectes Danae*, Smith), animal très commun sur le littoral brésilien. Ce sont les deux antagonistes qui provoquent les battements du fouet de l'exopodite des pattes-machoières. L'article qui les contient, est isolé au niveau de son articulation sur le basipodite, et placé dans le fixateur après ouverture au scalpel d'une fenêtre dans la cuticule de sa face interne. Le fixateur est une solution de tétroxyde

(1). — Deux travaux récents, qui sont parvenus à notre connaissance après l'élaboration de ce manuscrit, devraient être inclus dans le commentaire bibliographique: — The Fine Structure of a Multiterminal Innervation of an Insect Muscle, by G. A. EDWARDS, J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 1959, 5, 241.

— The Fine Structure and Morphological Organisation of the Peripheral Nerve-fibres and Trunks of the Cockroach, by A. HESS, Quart. J. Micr. Sc., 1958, 99, 333.

d'osmium à 3%, tamponnée au pH: 7,4-7,6 selon la méthode de PALADE, agissant pendant une heure à 18°C. Après rinçage et prélèvement hors du tégument, les muscles sont découpés en pièces pour la déshydratation et l'inclusion dans un mélange de 9 parties de méthacrylate de n-butyle avec une partie de méthacrylate de n-méthyle, dont la polymérisation est assurée par 1% de catalyseur Luperco CDB à 45°C. Les coupes, effectuées avec un microtome Porter-Blum, sont observées aux grossissements originaux de 2000 à 10500x, avec un microscope RCA, modèle EMU, à ouverture de l'objectif de 25 μ de diamètre.

RESULTATS

Les nerfs juxtaterminaux. Les principaux caractères de l'axone et de la gaine de Schwann d'un nerf de Crustacé, examinés en microscopie électronique, ont été rapportés par GEREN et SCHMITT (14, 15). Ces deux auteurs ont utilisé les nerfs de la patte locomotrice du Homard, c'est à dire des fibres nerveuses probablement coupées à un niveau assez éloigné de leurs terminaisons. Les micrographies des Figs. 2 à 7 présentent ici des nerfs ramifiés parmi les fibres musculaires où ils aboutissent et qui sont donc coupés au voisinage des synapses. D'autre part, obtenues à de faibles grossissements, elles permettent d'observer l'ensemble de la structure de ces nerfs juxtaterminaux d'un Crustacé.

Les premières études de l'organisation des nerfs périphériques des Crustacés semblent remonter à BIEDERMANN (16) qui a montré la présence, dans l'innervation d'un muscle, de deux fibres nerveuses suivant des trajets parallèles et se ramifiant de façon synchrone. Il estime, en rapport avec les phénomènes d'inhibition qu'il a mis en évidence sur le même matériel, que l'une des deux fibres est inhibitrice et l'autre motrice. Il suppose que toutes deux vont innover chaque fibre musculaire du muscle.

MANGOLD (17) retrouve ces deux fibres nerveuses parallèles avec leurs ramifications simultanées qu'il désigne par le terme de "ramifications diplotomiques". Il semble généraliser cette double innervation à tous les Arthropodes, à tous leurs muscles et même à toutes les fibres musculaires, puisqu'il voit pénétrer ensemble les deux fibres

nerveuses sous le sarcolemme, où elles peuvent encore se ramifier avant de prendre fin.

Ces deux auteurs (16, 17) avaient utilisé des colorations post-vitales au bleu de méthylène. D'ANCONA (18) emploie en outre une méthode d'imprégnation argentique dérivée de la technique de CAJAL au nitrate d'argent réduit. Il retrouve des nerfs à deux fibres nerveuses, mais il montre que beaucoup de nerfs contiennent trois fibres parallèles dans une même gaine, qui se divisent synchroniquement quand le nerf se bifurque. Il représente même le dessin d'un nerf à quatre fibres parallèles rencontré chez *Palinurus vulgaris*. Cependant, au niveau des terminaisons sur les fibres musculaires, il ne voit que deux fibres nerveuses parallèles, ou même une seule fibre.

La notion de triple innervation est introduite par HARREVELD et WIERSMA (19) qui montrent la présence constante, dans des muscles de l'Ecrevisse, de trois fibres nerveuses parallèles, de diamètres différents, dont ils désignent les ramifications simultanées par l'expression "ramifications triplotomiques". En excitant séparément chacun de ces axones, ils observent que le plus fin possède un rôle inhibiteur, que l'intermédiaire produit une contraction du type "slow", et que le plus épais donne une contraction du type "fast".

Ultérieurement, HARREVELD (12), par une étude histologique, conclut que dans le cas de nerfs à deux fibres (duplet) comme dans celui des nerfs à trois fibres (triplet), chacun des axones innerve chacune des fibres musculaires du muscle correspondant. Le même auteur (21) met aussi en évidence des nerfs contenant quatre ou cinq fibres nerveuses (quadruple et quintuple innervations) chez les Crustacés. A ces données fait suite toute une série de travaux par différents auteurs sur la physiologie neuromusculaire des Crustacés (cf. HOYLE, 22).

Des colorations avec des solutions très diluées de bleu de méthylène et des essais d'imprégnations argentiques, nous ont montré que les muscles utilisés dans ce travail, étaient innervés seulement par deux axones de diamètre différent (A_1 et A_2 , Fig. 1), présentant le même parcours parallèle et les ramifications diplotomiques décrits dans d'autres types de muscles, par les auteurs cités ci-dessus. L'axone fin est probablement l'inhibiteur, le plus gros correspondant à une innervation motrice simple.

Nous avons retrouvé cette double innervation sur de nombreuses micrographies électroniques. Dans la majorité des cas, on observe sur coupe, deux axones de taille inégale, au voisinage l'un de l'autre: A_1 et A_2 , Figs. 2 et 7. Comme cela avait déjà été remarqué en microscopie optique (18), les deux axones sont contenus dans une même enveloppe, l'ensemble constituant un nerf à deux fibres nerveuses (Figs. 2 et 7). Il y a également des nerfs juxtaterminaux ne comportant qu'un seul axone (Fig. 5), mais D'ANCONA avait signalé, et nous l'avons quelquefois observé avec le bleu de méthylène, qu'au niveau des dernières ramifications, les deux fibres nerveuses parallèles peuvent s'éloigner l'une de l'autre avant de se terminer. La coupe de la Fig. 5 représente sans doute un de ces ultimes rameaux solitaires. La Fig. 6 ne montre aussi qu'un seul axone, mais il est pour sa plus grande part en coupe sublongitudinale, à l'exception de son extrémité droite où il s'incurve; on ne peut donc savoir s'il s'agit d'un nerf à un ou deux axones, puisqu'il peut exister une autre fibre nerveuse parallèle à celle de la Fig. 6, dans les coupes précédentes ou suivantes. Le diamètre des nerfs juxtaterminaux rencontrés dans les muscles est assez constant et se situe aux environs de 7μ .

Un double système de gaines entoure les axones. Un premier type de gaine est particulier à chaque axone: g. S., Figs. 2 à 7. Il correspond à la formation que GEREN et SCHMITT (14, 15) ont appelée cellule de Schwann chez le Homard. Cette gaine forme une enveloppe de cytoplasme nucléé autour de l'axone, sa limite interne étant marquée par sa juxtaposition avec l'axoplasme, sa limite externe par une membrane basale assez épaisse qui le circonscrit. Un complexe de membranes relie la surface externe à la surface interne de cette gaine tubulaire, à travers son cytoplasme; il est l'équivalent du mésaxone de GASSER (23). Comme dans les nerfs de la patte locomotrice du Homard (14, 15), l'épaisseur de cette gaine est faible, de l'ordre de $0,1$ à $0,5 \mu$, sauf aux endroits où sont localisés les noyaux. Une seconde gaine plus externe (Pn, Figs. 2 à 7), est commune aux deux axones et à leur gaine de Schwann respective dont elle enveloppe l'ensemble. Elle est limitée extérieurement par une membrane basale épaisse qui forme aussi la limite du nerf vis-à-vis des espaces extracellulaires. Du côté interne, elle se termine au contact de la membrane basale qui entoure chaque gaine de Schwann.

La distance entre les deux membranes basales de cette gaine est très variable, ne serait-ce que par la position fréquemment excentrique des axones; elle atteint quelquefois $3,5 \mu$. Cette gaine peut être assimilée à l'enveloppe conjonctive = périlemme, décrite en microscopie optique chez les Insectes, par SCHARRER (24) pour les centres nerveux et par HOYLE (25) pour les nerfs. Ce périlemme comporte une partie nucléée = périneurium, surmontée d'une membrane épaisse, la "neural lamella", qui correspond ici à la membrane basale du nerf². Cette gaine conjonctive peut être considérée également comme l'équivalent de la gaine endoneurale des Vertébrés (= gaine de Henlé ou gaine de Key-Retzius). Cette dualité des gaines existe aussi dans le cas de nerf juxtaterminal à un seul axone comme celui de la Fig. 5.

Le mésaxone décrit à travers le cytoplasme schwannien un parcours remarquablement réduit. Dans les nerfs myéliniques des Vertébrés, il peut s'enrouler autour de l'axone une vingtaine de fois ou davantage (26). Chez les Insectes (8), il ne s'enroule pas régulièrement autour de l'axone, mais il fait un trajet prolongé avant de rejoindre la surface interne de la gaine de Schwann. Dans les nerfs de la patte locomotrice du Homard (14, 15), le mésaxone passe une ou deux fois autour de l'axone. Dans le cas présent des nerfs juxtaterminaux, le mésaxone ne tourne pas même une fois autour de l'axone, mais effectue tout son parcours dans une zone qui correspond à peu près au quart de la circonférence de la gaine de Schwann (Mx, Figs. 3, 4, 6 et 7). Dans la Fig. 5, le trajet du mésaxone semble plus long, mais il faut tenir compte de la forte obliquité du plan de coupe par rapport à l'axe du nerf. Dans la Fig. 6, le mésaxone est visible deux fois selon deux orientations de coupe différentes, l'une sublongitudinale, dans la moitié gauche de la micrographie, l'autre transversale dans la zone où le nerf s'incurve.

Les deux sortes de gaines sont nucléées. La Fig. 2 montre un noyau schwannien N. S. à proximité de l'axone A₁. Il est toujours facile de distinguer dans un nerf, un noyau schwannien d'un noyau du périneurium (N. Pn., Fig. 7) grâce à sa position par rapport à la membrane basale qui limite ce périneurium intérieurement. La pré-

(2). — Pour Scharrer, l'ensemble de la gaine conjonctive = périlemme, comporte une partie cytoplasmique = périneurium, revêtue d'une membrane épaisse, sans structure = neural lamella. Hoyle n'utilise pas le terme périneurium; il nomme périlemme la partie cytoplasmique pour la distinguer de la neural lamella.

sence d'un noyau entraîne une augmentation importante de l'épaisseur de la gaine de Schwann dont la surface externe est repoussée dans le périneurium; la distance entre l'axone et la paroi externe de la gaine de Schwann peut alors atteindre $3,5 \mu$. Dans le cas de la Fig. 2, le contour de l'axone n'est pas modifié, mais c'est le noyau qui se déforme pour se loger en partie entre l'axone et la limite externe de la gaine de Schwann. HOLMES (27) signale que dans le cas des nerfs myéliniques des Crustacés, au contraire des nerfs myéliniques des Vertébrés, les noyaux se trouvent à l'intérieur de la couche de myéline. Pour les nerfs amyéliniques juxtaterminaux, il est impossible de situer le noyau schwannien par rapport au mésaxone; en raison même de son parcours réduit, le mésaxone ne passe généralement pas au voisinage du noyau (Fig. 3). Les noyaux de la gaine de Schwann sont globuleux, plus ou moins ovoïdes ($3 \times 2 \mu$); les noyaux du périneurium sont aplatis ($6-7 \times 1,5 \mu$) et leur présence ne déforme pas les contours de la gaine périneuriale.

Parmi les autres inclusions cytoplasmiques de la gaine de Schwann, des profils d'endomembranes peuvent être assez abondants au voisinage du noyau (r. e., Fig. 3) et au contraire rares et dispersés dans les autres zones. Nous n'avons pas observé de mitochondries. Il n'est pas possible de préciser si la gaine de Schwann est ici syncytiale ou cellulaire. Le périneurium contient quelques mitochondries de petite taille ($1 \times 0,3 \mu$), de distribution éparsée, apparemment sans relations régulières avec un autre constituant de la gaine périneuriale. Deux ou trois strates d'une substance homogène analogue à celle des membranes basales, peuvent s'intercaler entre la neural lamella et la membrane basale interne du périneurium. Elles sont séparées par des zones de cytoplasme périneurial; elles sont reliées par les tractus de même nature qui décrivent un trajet oblique à travers le cytoplasme d'une strate à l'autre (Fig. 5, 6, 7). C'est en général la neural lamella la plus épaisse ($50-130 m\mu$), les autres strates étant d'autant plus fines qu'elles sont plus proches de l'axone. Parfois ces strates sont absentes, mais on retrouve toujours la trace de un ou deux tractus de même substance à trajet oblique, entre la neural lamella et la membrane basale interne du périneurium (Fig. 5).

Les dimensions des axones juxtaterminaux sont de l'ordre de $2,5$ à 3μ de diamètre pour A_1 et de $1,5$ à $1,8 \mu$ pour A_2 . La surface

de l'axoplasme est relativement régulière et sans relief, en comparaison avec les exemples donnés d'un axolemme hautement contourné chez le Homard (15). L'axoplasme contient de petites mitochondries de $0,25 \mu$ environ de diamètre et d'une longueur variable qui peut atteindre 3μ . Elles sont en position périphérique, sous l'axolemme, et leur plus grande dimension est orientée parallèlement à l'axe de la fibre nerveuse, comme cela est visible sur les coupes longitudinales de l'axone (Fig. 6). D'ANCONA (18) n'avait pas obtenu la mise en évidence des neurofibrilles; il signale que MANGOLD, qui attribuait les différences de diamètre des axones à des différences dans l'abondance des neurofibrilles, prétend les avoir vues, sans en donner cependant d'illustration. D'ANCONA semble donc mettre en doute leur existence dans les nerfs des Crustacés. Sur toutes nos micrographies électroniques de nerfs juxtaterminaux, les neurofilaments sont toujours bien visibles, parallèles à l'axe de la fibre nerveuse, distribués uniformément sur toute la surface de coupe de l'axone. Leur longueur, variable, peut atteindre $0,7 \mu$; leur diamètre est de l'ordre de 100 à 150 Å. Une autre inclusion axoplasmique est représentée par des granulations fortement osmiophiles, de 150 à 200 Å de diamètre (gr, Fig. 4). Elles sont réparties régulièrement dans tout l'axoplasme, mais ne sont pas toujours présentes dans toutes les préparations.

Les zones de jonction myoneurale. Les connaissances sur la distribution et la structure des jonctions neuromusculaires des Crustacés manquent encore de précisions. Un premier problème concerne le nombre de terminaisons nerveuses par fibre musculaire. HARREVELD (12) estime que pour une fibre musculaire de la pince de l'Ecrevisse, ce nombre se situe aux environs de quarante, peut-être plus en tenant compte que la technique utilisée, une imprégnation argntique, n'est pas parfaitement élective pour toutes les terminaisons. Il décrit autour de chaque fibre musculaire, un réseau nerveux d'où se détachent les rameaux les plus fins qui formeront les terminaisons nerveuses. Ce sont donc des fibres musculaires à "innervation multiple", terme qui désigne un grand nombre de jonctions myoneurales sur une même fibre musculaire, à ne pas confondre avec "innervation polyneurone" plus appropriée pour l'innervation d'une même fibre musculaire par plusieurs axones. Ultérieurement, HOLMES (13) a

cru devoir réfuter cette notion d'innervation multiple. Il fait d'abord remarquer que D'ANCONA ne décrit qu'une ou deux terminaisons par fibre musculaire. Après des essais personnels d'imprégnation argentique, il conclut que le réseau mis en évidence par HARREVELD à la surface des fibres musculaires provient seulement de l'imprégnation des fibres de collagène et de réticuline enveloppant la fibre musculaire. Selon HOLMES, il n'existe qu'une ou deux terminaisons nerveuses par fibre musculaire chez les Crustacés.

Un autre aspect de la jonction neuromusculaire qui, chez les Vertébrés, a provoqué jadis de nombreuses discussions, intervient à propos de la position de l'extrémité de l'axone par rapport au sarcolemme. Chez les Crustacés, MANGOLD (17) voit les extrémités des fibres nerveuses pénétrer sous le sarcolemme et même s'y ramifier encore avant de se terminer. D'ANCONA (18) insiste sur la variété des terminaisons nerveuses selon les espèces de Crustacés envisagées, mais il pense que toutes sont hypolemmales, suivant plusieurs modalités: les unes accompagnent des cloisons de sarcolemme qui pénètrent entre les myofibrilles; d'autres s'alignent parallèlement aux stries Z sur les faisceaux de myofibrilles; d'autres sont simplement visibles dans le sarcoplasme, entre le sarcolemme et les myofibrilles. Donc dans le cas des Crustacés, la microscopie optique semble avoir toujours conclu en faveur d'une jonction neuromusculaire hypolemmale.

Le sujet de l'innervation multiple sera traité plus en détails dans la discussion. Nous rapportons seulement ici, parmi les résultats, deux observations qui sont en faveur de sa réalité. D'une part, les colorations au bleu de méthylène montrent que les rameaux nerveux les plus fins sont répartis sur toute la surface de la fibre musculaire; il est donc permis de penser que les terminaisons nerveuses présentent la même distribution. D'autre part, nous n'avons pas choisi de zones particulières dans les fibres musculaires pour faire les préparations, les régions de jonction myoneurale ayant été rencontrées dans des coupes provenant de niveaux très divers de la longueur des fibres musculaires.

Parmi les différentes micrographies électroniques de jonctions neuromusculaires que nous avons obtenues, quatre exemples ont été retenus pour figurer dans ce travail. Les trois premiers correspondent à trois plans de coupe perpendiculaires entre eux, leur orientation

étant déterminée par rapport à l'axe de la fibre musculaire de la jonction myoneurale considérée: Figs. 8 et 9, coupe transversale; Fig. 10, coupe radiale; Figs. 11 et 12, coupe tangentielle. Le quatrième exemple, Fig. 13, montre aussi une coupe tangentielle, mais qui contient deux terminaisons nerveuses au contact d'une même fibre musculaire. La Fig. 8, effectuée à faible grossissement, permet de retracer brièvement les principaux caractères structuraux des fibres musculaires de l'exopodite des maxillipèdes, déjà décrits ailleurs (20, 28): grande abondance de sarcoplasme; myofibrilles groupées en colonnettes musculaires; mitochondries nombreuses et volumineuses, réparties en deux groupes, l'un faisant une couche continue de mitochondries sous le sarcolemme, l'autre situé auprès des faisceaux de myofibrilles; reticulum endoplasmique localisé entre les myofibrilles; granulations abondantes de glycogène dans le sarcoplasme.

D'après les coupes transversales et radiales, la zone synaptique est représentée par une dépression de la surface de la fibre musculaire dans laquelle s'engage l'extrémité de la fibre nerveuse. Le contour de cette dépression, examiné sur les coupes tangentielles, est de forme elliptique, probablement parce que l'extrémité de l'axone pénètre obliquement dans la dépression synaptique. Le fond de la dépression n'est pas toujours régulier, mais peut être recoupé par une cloison partielle (Cl, Fig. 11), comme si l'extrémité de l'axone présentait une ébauche de ramification, d'ailleurs très inégale. En réalité, il sera montré plus loin que la juxtaposition du sarcoplasme et de l'axoplasme offre des caractères de grande complexité, auxquels on pourra rapporter cet aspect. Sur la Fig. 13, deux dépressions synaptiques, de dimensions différentes, sont au voisinage l'une de l'autre, sur une même fibre musculaire, comme si deux fibres nerveuses de diamètre inégal prenaient contact avec la fibre musculaire. La profondeur des dépressions synaptiques, de l'ordre de $3,5 \mu$, est inférieure à l'épaisseur (jusqu'à 8μ) de la couche de sarcoplasme subsarcolemmale séparant les premières myofibrilles du sarcolemme. En conséquence, sur coupe tangentielle, il n'y a généralement pas de myofibrilles dans le champ d'observation, parce que le plan de coupe est passé seulement dans la couche subsarcolemmale de sarcoplasme, parmi les mitochondries groupées contre la membrane de la fibre musculaire; la terminaison nerveuse se trouve donc entourée seulement par des mitochondries

dans un cytoplasme dont on pourrait discuter la nature sarcoplasmique. Cependant, les mitochondries du sarcoplasme ont des dimensions et une structure particulières qui, ajoutées à la présence de granulations de glycogène, permettent de reconnaître avec certitude ce qui appartient à la fibre musculaire dans une telle coupe tangentielle. Ces données sont confirmées par la Fig. 13, où dans l'angle inférieur gauche, la coupe tangentielle, légèrement oblique, est passée par quelques myofibrilles; les grandes mitochondries, les granulations de glycogène et les myofibrilles y font bien partie d'une même organisation cellulaire correspondant à la fibre musculaire.

La membrane basale de la fibre musculaire ne participe pas à la constitution de la dépression synaptique. La Fig. 9 montre sa brusque interruption au bord de la zone où la surface de la fibre musculaire se déprime; seule subsiste de la fibre musculaire, la membrane plasmique³ qui forme le fond de la dépression. La coupe radiale de la Fig. 10 présente un cas particulier où la membrane basale de la fibre musculaire est ininterrompue et passe par dessus la terminaison nerveuse; mais la dépression synaptique y est aussi d'une profondeur plus faible en comparaison avec les autres exemples. Il est probable que la coupe soit passée dans une partie très latérale de la dépression, par un renforcement situé sous la membrane basale. Cette interprétation peut être concrétisée à l'aide de la Fig. 9, en imaginant le passage d'une coupe radiale dans la partie pauche de la dépression synaptique. A propos de la partie nerveuse de la synapse, la majorité de la gaine de Schwann et toute la gaine périneurale restent à l'extérieur de la dépression synaptique, au-dessus de l'extrémité de l'axone qu'elles recouvrent et séparent d'un contact direct avec le milieu extracellulaire. Quelques prolongements de la gaine de Schwann peuvent cependant s'insinuer dans la dépression, entre l'axone et la fibre musculaire (g. S., Fig. 9). La membrane basale de la fibre musculaire peut être en continuité avec une membrane basale des enveloppes de l'axone (Fig. 8), mais il n'a pas été possible d'observer le devenir de l'ensemble de la gaine périneurale et de ses structures au niveau de la terminaison nerveuse. Sur coupe tangen-

(3). — La définition du sarcolemme étant un sujet de discussion, ce terme est utilisé dans ce travail au sens large de limite de la fibre musculaire. Quand des précisions de structure sont nécessaires, les deux constituants principaux de cette limite sont désignés par membrane basale et membrane plasmique (= membrane sarcoplasmique) de la fibre musculaire.

tielle, les gaines de l'axone ne sont pratiquement pas détectables, ayant été emportées dans les coupes précédant celles qui passent par la dépression synaptique.

En résumé, dans ces exemples de jonctions neuromusculaires d'un Crustacé, l'extrémité de l'axone privé de ses gaines, limitée seulement par l'axolemme, se trouve engagée dans une dépression de la surface de la fibre musculaire où la membrane basale a disparu, et où seule demeure la membrane sarcoplasmique. En contradiction avec les observations de la microscopie optique, il y a donc une séparation continue entre l'axoplasme et le sarcoplasme, ce qui rejette ici la possibilité d'une jonction de l'axone avec l'une quelconque des zones transversales des myofibrilles et d'une terminaison nerveuse hypolemmale.

La juxtaposition des membranes plasmiques de l'axone et de la fibre musculaire est visible sur la coupe radiale de la Fig. 10, sur la coupe tangentielle de la Fig. 12 et dans certaines régions des Figs. 14, 15, 16 qui présentent des agrandissements partiels de la Fig. 13. La surface de contact entre l'axoplasme et le sarcoplasme se traduit, sur coupe, par des contours complexes qu'il est nécessaire de décomposer pour examiner les diverses possibilités de disposition des deux sortes de membranes plasmiques participant à la synapse myoneurale. Le cas le plus simple est celui des zones désignées par I sur les Figs. 10, 12, 14, 15. L'axolemme est juxtaposé à la membrane sarcoplasmique suivant une surface régulière, relativement sans relief. L'espace séparant les deux membranes est de l'ordre de 100 à 150 Å; il ne subit pas de grandes variations dans les différentes parties de la synapse. Une première complication se produit avec la différenciation vers le sarcoplasme, d'expansions d'axoplasme de formes et de dimensions très diverses. Ces formations sont particulièrement développées sur la Fig. 13. Le cas de la dépression synaptique partiellement cloisonnée de la Fig. 11 peut en être rapproché, la portion isolée de l'axoplasme étant considérée comme une expansion très volumineuse. Le plus souvent, du sarcoplasme se trouve interposé entre une telle expansion et l'axoplasme principal: IIa, Fig. 16, au point que parfois, du fait de la coupe, elle paraît complètement isolée au milieu du sarcoplasme: IIb, Fig. 15. Dans d'autres cas, l'expansion d'axoplasme est juxtaposée à l'axoplasme principal, sans inter-

position de sarcoplasme: IIc, Fig. 12; les deux membranes plasmiques en vis-à-vis sont alors de même nature et font partie de l'axolemme. Enfin, une zone de sarcoplasme peut être plus ou moins enveloppée par les contours irréguliers d'une expansion, au point de sembler, sur coupe, complètement encerclée d'axoplasme: IID, Fig. 16. Un autre type de complication se traduit par l'existence d'invaginations de l'axolemme dans l'axoplasme, qui peuvent rester simples, s'avancant seulement dans l'axoplasme comme une cloison incomplète: IIIa, Fig. 10; ou bien, compliquées par des courbures, des angles, des bifurcations, elles peuvent déterminer un compartimentage plus avancé et même paraître isoler, sur coupe, une zone d'axoplasme, quand par exemple, deux extrémités d'une invagination bifurquée se sont rejointes: IIIb, Fig. 10; dans certaines micrographies, on remarque bien, à leur contour arrondi, ces formations d'axoplasme isolées par les invaginations de l'axolemme: IIIb, Fig. 11, mais la partie de l'invagination qui les relie à l'axolemme principal périphérique n'est pas toujours visible, en raison du passage latéral de la coupe. La membrane sarcoplasmique peut aussi différencier des replis profonds et sinueux vers le sarcoplasme, où ne pénètre pas d'axoplasme: IV, Fig. 12; dans ce dernier cas, les deux membranes plasmiques juxtaposées sont toutes deux de nature sarcoplasmique.

Du fait de ces invaginations, la jonction neuromusculaire ne consiste donc pas ici, en une simple juxtaposition des membranes plasmiques de l'axone et de la fibre musculaire. Il semble qu'il se produise, au niveau de la terminaison nerveuse, un système complexe d'augmentation des surfaces de l'axolemme et de la membrane sarcoplasmique. D'autres études, en cours, sont nécessaires avant de pouvoir donner un schéma d'ensemble de ce type de jonction myoneurale.

Sarcoplasme et axoplasme terminaux. Il existe également peu de données précises au sujet de l'influence de la terminaison nerveuse sur l'organisation du sarcoplasme. Dans les muscles de trois espèces de Macroures, D'ANCONA (18) ne constate aucune différenciation particulière du sarcoplasme au voisinage de la synapse; par contre, chez *Carcinus maenas*, les terminaisons seraient du type à plaque motrice, avec une sole granuleuse sarcoplasmique. Les travaux ultérieurs n'abordent pas cet aspect de la jonction myoneurale des Crustacés.

Dans les fibres musculaires des maxillipèdes du Crabe Bleu, aucun épaississement particulier du sarcoplasme périphérique n'a été remarqué au voisinage de la synapse. Il a d'ailleurs été signalé plus haut que l'épaisseur du sarcoplasme subsarcolemmal était supérieure à la profondeur de la dépression synaptique; elle peut atteindre 8μ , alors que le maximum observé de la profondeur des dépressions synaptiques, n'excède pas 4μ .

Chez les Vertébrés (10,6) et chez les Insectes (8, 9), la jonction neuromusculaire est caractérisée par une accumulation de mitochondries dans le sarcoplasme et dans l'axoplasme. Dans le cas présent, seul l'axoplasme terminal présente une abondance plus grande de mitochondries. Alors que dans les nerfs juxtaterminaux, les mitochondries sont seulement localisées contre l'axolemme, au niveau de la terminaison nerveuse, elles ont au contraire tendance à occuper tout le volume de l'axoplasme, ou même à se grouper au centre. Les mitochondries de l'axoplasme terminal sont d'aspect très varié, arrondies, ovales, allongées, présentant des étranglements ou des angles qui leur donnent une forme en V (Fig. 13). De petit diamètre ($0,2$ à $0,5 \mu$), elles peuvent dépasser 2μ de longueur. Elles ne montrent aucune orientation prédominante de leur plus grande dimension par rapport à une orientation quelconque de l'axone, au contraire des mitochondries de l'axoplasme juxtaterminal. Leur structure est du type classique à lamelles. Les mitochondries du sarcoplasme n'ont pas une distribution modifiée au voisinage de la synapse. Leur répartition demeure selon deux groupes, l'un sous la membrane limitante de la fibre musculaire, l'autre auprès des faisceaux de myofibrilles. Elles sont bien plus volumineuses que les mitochondries de l'axoplasme, avec un diamètre moyen de $1,5 \mu$ et une longueur atteignant 6μ . Leur structure est aussi différente et présente un réseau complexe de membranes à travers la matrice mitochondriale. Il n'y a pas non plus augmentation du nombre des noyaux du sarcoplasme auprès de la jonction myoneurale; dans les micrographies présentées, un seul noyau est partiellement visible sur la Fig. 13, montrant une structure typique avec des amas périphériques de chromatine et une double membrane interrompue par les pores (Fig. 14).

Les formations vésiculaires caractéristiques des zones synaptiques, décrites par DE ROBERTIS et BENNETT (29), se retrouvent

ici dans l'axoplasme terminal, avec leur aspect habituel, comportant une limite externe dense, de contour subcirculaire, autour d'une partie centrale plus claire. D'un diamètre allant de 250 à 400 Å, elles sont distribuées irrégulièrement par groupes qui en renferment un nombre variable; les groupes les plus importants sont en général à proximité d'une zone de juxtaposition de l'axolemme avec la membrane sarcoplasmique, les petits groupes de quelques vésicules ou les vésicules isolées se rencontrant dans tout le volume de l'axoplasme terminal. Cependant, de larges zones de contact de l'axoplasme avec le sarcoplasme sont quelquefois dépourvues de vésicules synaptiques. Les vésicules sont aussi absentes en face du cytoplasme schwannien, quand des parties de la gaine de Schwann sont engagées dans la dépression synaptique; elles sont souvent accumulées autour des îlots d'axoplasme délimités par les invaginations de l'axolemme (Figs. 11, IIIb). A proximité d'un groupe de vésicules, les membranes plasmiques juxtaposées sont plus denses (Fig. 12), comme s'il avait accumulation d'une substance plus osmiophile à cet endroit, fait déjà remarqué par PALAY (30) dans le cas de synapses inter neuronales. Les granules denses de l'axoplasme des nerfs juxtaterminaux sont aussi présents dans l'axoplasme terminal avec les mêmes dimensions et la même distribution.

Toujours bien individualisés dans les axones juxtaterminaux, les neurofilaments disparaissent de l'axoplasme terminal, comme cela a déjà été mis en évidence dans d'autres groupes d'animaux (6,8). Cependant, sur la Fig. 13, la surface de coupe de l'axone A_1 est recouverte, entre les mitochondries, les vésicules synaptiques et les granules denses, par des structures très fines, évoquant des neurofilaments moins nettement figurés, à contours et à densité atténués, comme si la disparition des neurofilaments était progressive. Dans l'axoplasme, il y a encore quelques profils de membranes à rapprocher probablement d'un reticulum endoplasmique qui serait très diffus. Dans le sarcoplasme, le reticulum endoplasmique est très développé et seulement localisé dans les colonnettes musculaires, entre les myofibrilles. N'existant pratiquement pas dans les larges zones de sarcoplasme subsarcolemmal, il ne montre aucun développement particulier au niveau de la jonction myoneurale, au contraire de ce qui a été vu chez les Insectes (8, 9). On constate la présence de reticulum

sarcoplasmique au voisinage de la synapse seulement si un faisceau de myofibrilles est lui-même auprès de la dépression synaptique. Même dans ce cas, le reticulum demeure entre les myofibrilles, sans émettre de prolongements spéciaux vers la zone de jonction et sans présenter une quelconque modification (Fig. 10). Dans le sarcoplasme, on remarque encore la présence de nombreuses granulations qui facilitent la distinction entre la fibre musculaire et l'axone, dans la zone d'intrication complexe de l'axoplasme et du sarcoplasme bordant la dépression synaptique. Ces granulations ne sont pourtant pas caractéristiques de la jonction myoneurale; elles existent par amas irréguliers dans tout le volume de la fibre musculaire (Fig. 8). Il a été montré par la réactions de Mac Manus que ces granulations sont constituées par du glycogène (28).

En plus de l'inégalité des diamètres des deux terminaisons nerveuses de la Fig. 13, il y a aussi des différences dans l'aspect des constituants de l'axoplasme. Les vésicules synaptiques, nombreuses en A_1 , sont beaucoup plus rares en A_2 ; les structures fines, rappelant des neurofilaments "atténués", sont de même abondantes en A_1 et très dispersées en A_2 ; les mitochondries de A_2 ont des dimensions inférieures à celles de A_1 ; elles sont groupées au centre de l'axoplasme en A_2 ; elles sont réparties sur toute la coupe de A_1 , où leurs formes sont aussi plus variées; enfin, les granulations osmiophiles énigmatiques sont moins nombreuses par unité de surface en A_2 qu'en A_1 . Ces différences d'ultrastructures ne sont pas perceptibles quand deux terminaisons, qui ne sont pas totalement séparées, proviennent d'une ramification terminale incomplète de l'axone.

DISCUSSION

En comparant la structure des nerfs des pattes locomotrices du Homard, décrite par GEREN et SCHMITT (14, 15), avec celle des nerfs juxtaterminaux du Crabe Bleu, il apparaît un certain nombre de différences. Certaines sont peut-être seulement des différences de terminologie, comme par exemple à propos des enveloppes conjonctives. En effet, les micrographies de ces deux auteurs montrent, autour des gaines de Schwann des axones, un tissu comportant des strates successives de substance d'aspect homogène = "connective tissue", séparées par un cytoplasme nucléé = "connective tissue cell". Il est

probable que la gaine périneurale des nerfs juxtaterminaux du Crabe Bleu soit l'équivalent de ces formations, bien que les micrographies des nerfs du Homard, effectuées à fort grossissement, ne permettent pas de voir si le tissu conjonctif forme une gaine commune aux axones et à leur gaine de Schwann respective, limitée à l'extérieur par une membrane basale du type neural lamella. Il y a cependant des différences dans l'organisation même des deux sortes de nerfs. On ne retrouve pas dans les nerfs juxtaterminaux, cette disposition des fibres nerveuses du type "C" des Vertébrés (23), partageant à plusieurs une gaine de Schwann commune, telle que GEREN et SCHMITT l'ont rencontrée pour les fibres nerveuses fines du nerf du Homard. Chaque axone possède ici sa propre gaine de Schwann dont l'individualité est soulignée par la membrane basale interne de la gaine périneurale. Mais il se peut également que les fibres nerveuses à gaine de Schwann commune des nerfs du Homard n'appartiennent pas à l'innervation motrice des fibres musculaires des pattes locomotrices.

Les parties équivalentes des gaines des axones sont plus développées dans les nerfs des pattes du Homard que dans les nerfs juxtaterminaux étudiés ici: strates du tissu homogène plus épaisses, plus nombreuses, plus serrées dans la gaine périneurale; mesaxone à parcours plus long dans la gaine de Schwann. Ces variations pourraient s'attribuer à des différences dans l'organisation du nerf selon les espèces ou selon les appendices considérés, mais elles peuvent dépendre aussi du niveau de la coupe par rapport au trajet du nerf entre la chaîne et les terminaisons nerveuses. Dans ce dernier cas, la proximité de la terminaison se traduirait par une simplification des gaines de l'axone. D'autre part, il a été signalé qu'à un même niveau juxtaterminal, les nerfs présentent des gaines périneuriales inégalement développées, notamment vis-à-vis du nombre des strates de substance homogène. Du fait de l'innervation multiple et de la distribution des potentiels de jonction (31), on peut admettre une constance relative du nombre de terminaisons nerveuses par unité de surface de la fibre musculaire. Cela implique, avec la croissance de la fibre musculaire après chaque mue du Crabe, la formation de ramifications nouvelles de nerfs juxtaterminaux pour accroître le nombre des terminaisons nerveuses. Il y aurait ainsi, à un même niveau juxtaterminal de l'in-

nervation, des rameaux nerveux d'âge différent pour lesquels le faible développement des gaines de l'axone serait un caractère de "jeunesse". Ces dernières données, pour le moment hypothétiques, sont en cours d'étude pour tenter d'interpréter les différences, quelquefois importantes, qui apparaissent dans le développement des gaines des nerfs d'un même niveau. Pour SCHARRER (24) et HOYLE (25), la neural lamella est secrétée par le périneurium au niveau de la membrane plasmique sous-jacente. Ceci suggère que la membrane basale, qui circonscrit les gaines de Schwann, est un produit d'élaboration de la face interne du périneurium, son origine étant sans rapport avec la gaine de Schwann. De même, les strates intercalaires du périneurium sont doublées d'une membrane de $12 \text{ m}\mu$ d'épaisseur (inset 5' de la Fig. 5), limitant le cytoplasme périneurial. Il est possible que ces strates intermédiaires correspondent à une subdivision de la gaine périneuriale, en unités qui seraient cellulaires.

Au sujet des différences entre les résultats de HOLMES (13) et de HARREVELD (12), plusieurs arguments interviennent en faveur de l'innervation multiple des fibres musculaires des Crustacés. 1) — Les observations de D'ANCONA ne sont pas en opposition avec l'existence d'une innervation multiple; chez *Astacus*, il décrit, autour des fibres musculaires, un réseau de fines fibres nerveuses à partir duquel prennent naissance les ultimes rameaux qui forment les terminaisons nerveuses; ceci est très proche des données de HARREVELD. 2) — Il y a certainement autour de chaque fibre musculaire, un revêtement important de fibres collagènes qui, comme nous l'avons aussi constaté, s'imprègne plus facilement à l'argent que les fibres nerveuses; cela n'exclut cependant pas la présence de fibres nerveuses, réparties sur toute la surface de la fibre musculaire, camouflées en quelque sorte par une imprégnation argentique du collagène semblable à celles effectuées par HOLMES. 3) — Avec des solutions très diluées de bleu de méthylène, seules sont colorées les fibres nerveuses; nous avons pu remonter la succession des ramifications nerveuses depuis les branches les plus fines, distribuées à la surface des fibres musculaires, jusqu'aux axones principaux qui, à la surface des muscles, sont en provenance directe du tronc nerveux de l'appendice; l'électivité du bleu de méthylène en coloration post-vitale pour les fibres nerveuses et la polarité du réseau nerveux, per-

mettent de distinguer ce dernier du réseau de fibres collagènes. 4) — Il a été déjà remarqué que les zones synaptiques ont été rencontrées dans des coupes provenant de diverses régions des fibres musculaires, sans recherche de niveaux préférentiels comme cela est nécessaire dans le cas de la plaque motrice des Vertébrés (6); ce simple fait de technique est également en faveur d'une répartition diffuse des terminaisons nerveuses sur toute la surface de la fibre musculaire. 5) — FATT et KATZ (31) ont montré, par des enregistrements intracellulaires dans des fibres musculaires de Crustacés, que les potentiels de plaque motrice, ou mieux selon HOYLE et WIERSMA (32), les potentiels de jonction, sont distribués sur toute la longueur de la fibre musculaire, avec de faibles variations de leur amplitude locale. D'autre part, au contraire de ce qui fut observé chez les Vertébrés (10, 33, 6), les terminaisons nerveuses ne modifient pas la distribution des mitochondries dans le sarcoplasme. Ce caractère est peut-être en rapport avec l'innervation multiple, étant données les fonctions importantes des mitochondries dans les réactions du métabolisme cellulaire. En effet, dans le cas d'une plaque motrice, l'origine de l'excitation provoquant la contraction de toute la fibre musculaire se localise en un seul point, siège d'une activité enzymatique intense qui se traduit par une accumulation de mitochondries. Dans le cas de l'innervation multiple, il y a partage de cette activité entre les nombreuses terminaisons nerveuses, cette dispersion n'impliquant pas de modification dans la répartition des mitochondries de la fibre musculaire au niveau des synapses.

Les terminaisons nerveuses sont épilemmales par rapport à la limite de la fibre musculaire dans les muscles des maxillipèdes du Crabe Bleu. En raison des observations antérieures de la microscopie optique, faut-il restreindre cette donnée au seul cas de ces muscles, ou bien certaines particularités des fibres musculaires ou des jonctions myoneurales des Crustacés sont-elles responsables d'une description inexacte de terminaisons hypolemmales? Une première cause d'erreur est possible avec l'interruption de la membrane basale de la fibre musculaire au niveau de la dépression synaptique; c'est principalement cette membrane qui, en microscopie optique, représente la limite de la fibre musculaire, et son interruption peut être à l'origine des descriptions du passage de la terminaison nerveuse à travers le

sarcolemme. D'autre part, le revêtement de fibres conjonctives autour des fibres musculaires a pu être considéré également comme faisant partie du sarcolemme; or très souvent, des fibres nerveuses sont engagées sous cette couche, pouvant même s'y ramifier avant de prendre fin. Il existe aussi, dans les fibres des appendices locomoteurs, des cloisons partielles insinuées entre les myofibrilles et contenant de fins rameaux nerveux; l'étude de leur développement en fonction de la croissance (34) a montré qu'il s'agit de replis invaginés de la membrane limitante de la fibre musculaire, c'est-à-dire que les fibres nerveuses correspondantes demeurent à l'extérieur de la membrane sarcoplasmique; mais en l'absence de coloration mettant en évidence ces formations, il est facile d'imaginer comment, sur des coupes d'histologie, des fibres nerveuses peuvent être localisées plus ou moins profondément à l'intérieur de la fibre musculaire selon l'ampleur des replis. Enfin, nous avons obtenu plusieurs fois, avec les imprégnations argentiques, les aspects de fines fibres disposées contre les faisceaux de myofibrilles, parallèlement aux lignes Z; ces structures sont en réalité présentes dans tout l'ensemble du faisceau de myofibrilles, puisqu'apparaissant sur toute une série de coupes longitudinales successives; comme D'ANCONA l'avait lui-même remarqué, elles sont sans relation avec des fibres nerveuses situées à l'extérieur de la fibre musculaire; il est plus vraisemblable qu'elles soient le produit de dépôts d'argent sur les formations périodiques du reticulum endoplasmique localisé entre les myofibrilles. La majorité des observations de terminaisons nerveuses intrasarcoplasmiques en microscopie optique est donc passible de réserves.

L'innervation multiple et la complexité des contours des deux membranes plasmiques juxtaposées au niveau de la jonction neuro-musculaire, doivent avoir pour conséquence une augmentation importante de la surface de la membrane de la fibre musculaire. FATT et KATZ (35), mesurant la capacité de membrane de fibres musculaires de Crustacés, ont obtenu des valeurs anormalement élevées, de l'ordre de $40 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Ces deux auteurs ont envisagé une explication possible dans l'existence de replis et de circonvolutions au niveau des terminaisons nerveuses, augmentant considérablement la surface de la membrane. Dans des fibres musculaires d'appendices locomoteurs, il nous avait semblé (34) qu'un système de replis invaginés

du sarcolemme, indépendant de l'innervation de la fibre musculaire, pouvait rendre compte en partie, de la valeur élevée de la capacité de membrane. Dans les fibres musculaires des maxillipèdes, ce système de replis n'existe pratiquement pas. Il y a donc seulement, comme processus d'augmentation de surface de la fibre musculaire, que les circonvolutions complexes de la membrane sarcoplasmique dans les dépressions synaptiques. Si la capacité de membrane est ici aussi forte que dans le cas des fibres musculaires des appendices locomoteurs, l'hypothèse de FATT et KATZ se trouverait confirmée.

Dans les fibres musculaires d'autres groupes d'animaux, il y a des relations, d'une part entre les tubules du reticulum endoplasmique situés en face des lignes Z et M des myofibrilles et la membrane sarcoplasmique (36, 37), d'autre part entre le reticulum et les replis digitaux de la synapse myoneurale (39); chez les Insectes (9), le reticulum présente en outre une ramification profuse de tubules au voisinage de la jonction neuromusculaire. Sur ces observations, une hypothèse a été avancée (38, 39) à propos de la contraction musculaire, selon laquelle le reticulum endoplasmique serait le support d'une conduction intracellulaire de l'onde de dépolarisation depuis la membrane sarcoplasmique jusqu'aux différents sarcomères des myofibrilles. Dans le cas des fibres musculaires des maxillipèdes du Crabe Bleu, le reticulum endoplasmique est bien développé, mais seulement localisé dans les colonnettes musculaires, entre les myofibrilles; il n'est pratiquement pas perceptible dans les larges zones de sarcolemme séparant les colonnettes musculaires les unes des autres, ou séparant les myofibrilles de la membrane sarcoplasmique; il ne montre pas de relations spéciales avec la jonction neuromusculaire et n'affecte aucune disposition particulière au niveau de cette dernière. L'organisation du reticulum endoplasmique de ce type de fibre musculaire ne semble donc pas permettre de le considérer comme le support morphologique possible d'une conduction intrasarcoplasmique de l'onde de dépolarisation.

Un dernier aspect à commenter parmi les observations de ce travail, est celui de la Fig. 13, où deux terminaisons nerveuses se présentent en jonction avec une même fibre musculaire coupée tangentiellement. Ces deux terminaisons correspondent-elles à l'extrémité de deux rameaux d'un même axone, ou sont-elles chacune la

terminaison d'une axone différent? Une réponse indiscutable à cette question ne peut pas être apportée d'après de simples données morphologiques. Cependant, un certain nombre de différences dans l'ultrastructure de l'axoplasme des deux terminaisons a déjà été signalé. D'autre part, la différence de diamètre des deux jonctions neuromusculaires rappelle l'inégalité de taille des deux axones des nerfs juxtaterminaux, si toutefois elle n'est pas due au passage de la coupe à un niveau différent dans les deux dépressions synaptiques. Enfin, sur des coupes de même matériel examinées au microscope à contraste de phase, nous avons rencontré plusieurs fois des fibres nerveuses distinctes, à parcours parallèles, se terminant au voisinage l'une de l'autre sur une même fibre musculaire. Il est donc permis d'envisager que sur la Fig. 13, la zone de synapse myoneurale la plus grande correspond à l'axone A₁ et la plus petite à l'axone A₂, les deux axones différents faisant jonction avec une même fibre musculaire, selon les données de l'innervation double.

RÉSUMÉ

Ce travail rapporte les premières observations de jonctions neuromusculaires rencontrées au cours d'une étude au microscope électronique sur les muscles des maxillipèdes du Crabe Bleu (*Callinectes Danae*, Smith). Quelques données concernent la structure des nerfs juxtaterminaux, principalement au sujet des constituants de l'axoplasme et des gaines des deux axones inégaux qui forment l'innervation double de ces muscles. Au niveau de la jonction neuromusculaire, l'extrémité de l'axone, dépourvue de ses gaines, est engagée dans une dépression de la surface de la fibre musculaire où la membrane basale a disparu et où seule subsiste la membrane sarcoplasmique. Des expansions d'axoplasme vers le sarcoplasme, des replis de l'axolemme dans l'axoplasme et de la membrane sarcoplasmique dans le sarcoplasme, déterminent au niveau de la jonction neuromusculaire, un système complexe d'augmentation de la surface des membranes axo- et sarco-plasmiques. Dans l'axoplasme terminal, la distribution des mitochondries est modifiée, les neurofilaments s'estompent et les vésicules synaptiques sont réparties par groupes irréguliers; par contre, le sarcoplasme n'offre pas de changement sensible dans l'organisation de ses constituants auprès de la synapse. Un exemple de deux ter-

minaisons nerveuses au contact d'une même fibre musculaire est décrit et discuté.

Pour l'aide reçue sous de multiples formes au cours de ce travail, nous exprimons toute notre reconnaissance au Docteur Helena LOPES DE SOUZA-SANTOS, au Docteur Persio DE SOUZA-SANTOS, au Professeur Paulo SAWAYA et au Professeur Paulo RIBEIRO DE ARRUDA.

Ce travail a pu être réalisé grâce à la contribution substantielle du Conseil National de Recherches du Brésil, et de l'Université de São Paulo.

RESUMO

Este trabalho relata as primeiras observações de junções neuromusculares encontradas durante um estudo com o microscópio eletrônico sobre os músculos dos maxilípodos do Sirí Azul (*Callinectes Danae*, Smith). Alguns dados tratam da estrutura dos nervos juxtaterminais, principalmente a respeito dos constituintes do axoplasma e das bainhas dos dois axônicos desiguais, que formam a inervação dupla desses músculos. Ao nível da junção neuromuscular, a extremidade do axônio, desprovida das suas bainhas, se introduz numa depressão da superfície da fibra muscular onde desapareceu a membrana basal e somente subsiste a membrana sarcoplásmica. Expansões de axoplasma em direção do sarcoplasma, dobras do axolema dentro do axoplasma e da membrana sarcoplásmica dentro do sarcoplasma, determinaram, ao nível da junção neuromuscular, um sistema complexo de aumento da superfície das membranas axo- e sarco-plásmicas. Dentro do axoplasma terminal, a distribuição das mitocôndrias é modificada, os neurofilamentos desaparecem e as vesículas sinápticas repartem-se por grupos irregulares; ao contrário, o sarcoplasma não apresenta modificações sensíveis da organização dos seus constituintes na proximidade da sinapse. Um exemplo de duas terminações nervosas ao contacto de uma mesma fibra muscular é descrito e discutido.

BIBLIOGRAFIE

1. Beams, H. W., et Evans, T. C., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1953, 82, 34.
2. Palade, E. G., Anat. Rec., 1954, 118, 335.
3. Reger, J. F., Anat. Rec., 1954, 118, 344.
4. Robertson, J. D., Anat. Rec., 1954, 118, 346.
5. Reger, J. F., Anat. Rec., 1955, 122, 1.
6. Robertson, J. D., J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 1956, 2, 381.
7. Reger, J. F., Exp. Cell Research, 1957, 12, 662.

8. Edwards, G. E., Ruska, H., et De Harven, E., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1958, 4, 107.
9. Edwards, G. E., Ruska, H., et De Harven, E., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1958, 4, 251.
10. Couteaux, R., *Rev. Canad. Biol.*, 1947, 6, 563.
11. Couteaux, R., et Taxi, J., *Arch. anat. micr. et morphol. expl.*, 1952, 41, 352.
12. Harreveld, A. Van, *J. Comp. Neurol.*, 1939, 70, 267.
13. Holmes, W., *Nature*, 1943, 151, 531.
14. Geren, B. B., et Schmitt, F. O., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1954, 40, 863.
15. Geren, B. B., et Schmitt, F. O., in: *Fine Structure of Cells. Internat. Union Biol. Sc., Series B, (21)*, New York, Interscience Publishers, Inc, 1955.
16. Biedermann, W., *S. B. Akd. Wiss. Wien, Abt. 3*, 1887, 95, 7.
17. Mangold, E., *Zeitschr. Allg. Physiol.*, 1905, 5, 135.
18. D'Ancona, U., *Trabaj. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid*, 1925, 23, 293.
19. Harreveld, A. Van, et Wiersma, C. A. G., *J. Exp. Biol.*, 1937, 14, 448.
20. Lavallard, R., Souza Santos, H., Souza Santos, P., et Sawaya, P., *An. Acad. Brasil. Ci.*, 1958, 30, XX.
21. Harreveld, A. Van, *J. Comp. Neurol.*, 1939, 70, 285.
22. Hoyle, G., *Comparative physiology of the nervous control of muscular contraction. In: Cambridge monographs in Experimental Biology*, Cambridge University Press, 1957.
23. Gasser, H. S., *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* 1952, 17, 32.
24. Scharrer, B. C. J., *J. Comp. Neurol.*, 1939, 70, 77.
25. Hoyle, G., *Nature*, 1952, 169, 281.
26. Robertson, J. D., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1955, 1, 271.
27. Holmes, W., *Phil. Trans. Roy. Soc. London, B*, 1942, 231, 293.
28. Lavallard, R., Souza Santos, H., Souza Santos, P., et Sawaya, P., *Ciência e Cultura*, 1959, 1 25.
29. De Robertis, E. D. P., et Bennett, H. S., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1955, 1, 47.
30. Palay, S. L., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1956, 2, N.º 4, suppl., 193.
31. Fatt, P., et Katz, B., *J. Exp. Biol.* 1953, 30, 433.
32. Hoyle, G., et Wiersma, C. A. G., *J. Physiol.*, 1958, 143, 403.
33. Noel, R., *Biol. méd., Paris*, 1950, 39, 273.
34. Lavallard, R., *C. R. Acad. Sci., Paris*, 1957, 244, 2553.
35. Fatt, P., et Katz, B., *J. Physiol.*, 1953, 120, 171.
36. Edwards, G. A., Ruska, H., Souza Santos, P., et Vallejo-Freire, A., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1956, 2 N.º 4, suppl., 143.
37. Porter, K. R., et Palade, G. E., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1957, 3, 269.
38. Bennett, H. S., *Am. J. Phys. Med.*, 1955, 34, 46.
39. Ruska, H., Edwards, G. A., et Caesar, R., *Experientia*, 1958, 14, 117.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I

Fig. 1 — Micrographie optique d'une préparation de muscle des maxillipèdes du Crabe Bleu, traitée par du nitrate d'argent. Les deux axones, A_1 et A_2 , de l'innervation double, présentent un cas de ramification diplotomique; cependant seule est visible la ramification de A_1 , en raison du recouvrement de celle de A_2 par le fond noir d'un noyau. En Nf sont perceptibles les contours du nerf qui contient les deux axones A_1 désigne l'axone le plus épais, et Nf, l'ensemble du nerf. N = noyaux, (x 1800).

Fig. 2 — Micrographie électronique d'une coupe de nerf juxtaterminal dans un muscle des maxillipèdes du Crabe Bleu. Cette micrographie doit être comparée avec celle de la Fig. 7. Un tel nerf comporte deux axones A_1 et A_2 d'inégal diamètre, A_1 représentant le plus épais. Chaque axone est entouré d'une gaine de Schwann (g. S.) particulière, l'ensemble étant enveloppé par une gaine périneuriale commune. Cette dernière est limitée, intérieurement par une membrane basal (m. b.) qui circonscrit chaque gaine de Schwann, extérieurement par une membrane basale épaisse, la neural lamella (n. l.) qui est aussi la paroi du nerf vis-à-vis des espaces extracellulaires (ex); la partie cytoplasmique, ou périneurium (Pn), est traversée obliquement par un tractus (tr) de substance homogène semblable à celle des membranes basales.

Bien séparées l'une de l'autre dans la Fig. 7, les deux gaines de Schwann sont ici mitoyennes. La coupe est passée au niveau d'un noyau de la gaine de Schwann de A_1 (N. S.). Normalement de faible épaisseur, la gaine de Schwann se distend considérablement vers le périneurium au niveau d'un noyau; le contour de l'axone reste régulier; c'est le noyau qui se déforme pour se loger entre l'axone et la paroi externe de la gaine de Schwann.

Mt₁ = mitochondries de l'axoplasme; nf = neurofilaments; st = strate intermédiaire dans le périneurium; Sp = sarcoplasma. (x 9200).

Fig. 3 — Même préparation que dans la Fig. 2, photographiée avec un grandissement supérieur pour montrer la gaine de Schwann au niveau d'un noyau. La limite interne de la gaine de Schwann est marquée par la juxtaposition de son cytoplasme avec l'axoplasme: S-A; sa limite externe est située contre la membrane basale (m. b.) du périneurium. Le mésaxone (Mx) décrit un trajet réduit qui ne passe pas auprès du noyau schwannien; autour de ce dernier, des profils d'endomembranes (r. e.) sont assez abondants. Autres légendes comme précédemment (x 20000).

Fig. 4 — Micrographie électronique d'une portion de fibre nerveuse avec les constituants de l'axoplasme: mitochondries (Mt₁) localisées à la périphérie; neurofilaments (nf) et granulations osmiophiles énigmatiques (gr) distribuées dans tout l'axoplasme. Le trajet du mésaxone entre les surfaces externe et interne de la gaine de Schwann est notablement court, surtout s'il est tenu compte de l'obliquité de la coupe. Autres légendes comme précédemment. (x 19200).

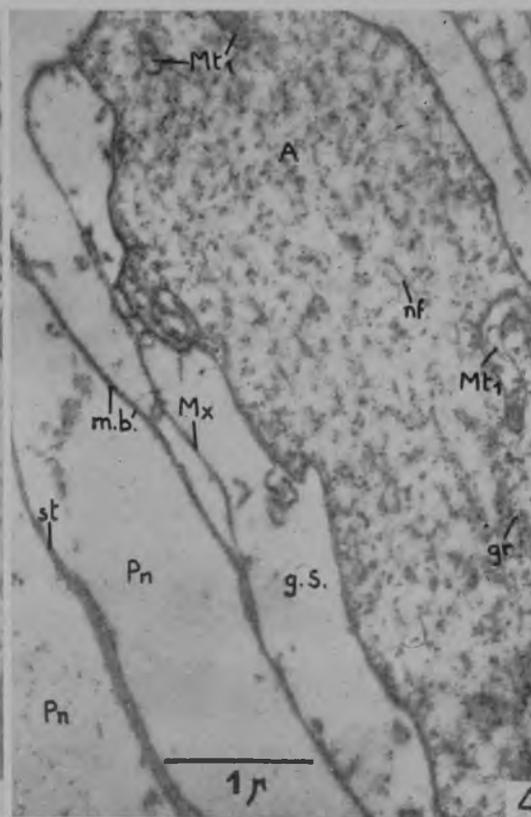
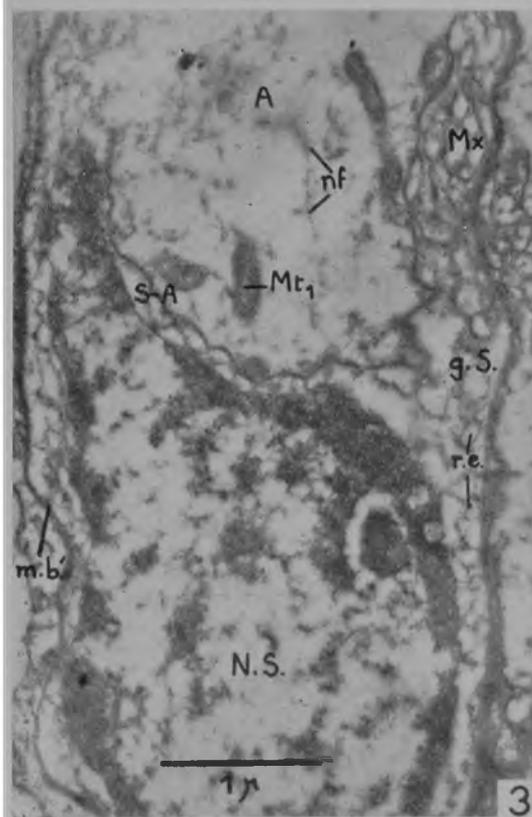
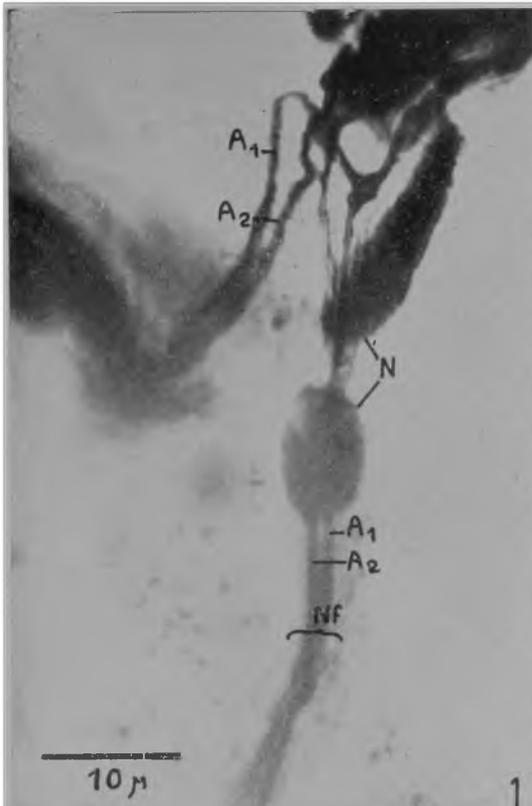


PLANCHE II

Fig. 5 — Coupe d'un nerf juxtaterminal comportant un seul axone. L'organisation des gaines est la même que dans un nerf à deux axones; la gaine périneurale, limitée extérieurement par une neural lamella, montre des tractus obliques (tr) de substance d'aspect homogène reliant ses deux faces, en l'absence de strates intermédiaires du périneurium. Quelques mitochondries (mt) sont visibles dans le périneurium, sans relations apparentes avec d'autres constituants. Le mesaxone paraît plus allongé du fait de la forte obliquité de la coupe. Légendes comme précédemment. (x 7300).

Inset 5' — Agrandissement local d'une strate intermédiaire du périneurium. La membrane épaisse de substance d'aspect homogène semblable à une membrane basale est doublée par une membrane plus fine, probablement cytoplasmique. (x 62000).

Fig. 6 — La coupe passe longitudinalement par un nerf juxtaterminal qui s'infléchit brusquement dans la partie droite de la Fig. Un seul axone est visible dans le nerf, mais du fait de l'orientation sublongitudinale, un autre axone parallèle peut exister dans les coupes précédant ou suivant celle de la micrographie. Le périneurium présente plusieurs strates de substance d'aspect homogène interposées entre sa limite interne (m. b.) et la neural lamella (n. l.). Le mesaxone apparaît en deux endroits, d'une part très allongé en Mx' parce qu'en coupe longitudinale, d'autre part en coupe transversale en Mx'' où il est très court. Dans l'axoplasme, l'orientation de la plus grande dimension des mitochondries et des neurofilaments est parallèle à l'axe de la fibre nerveuse, ce qui se vérifie au niveau de la courbure de l'axone par le raccourcissement de ces structures. (x 13500).

Fig. 7 — Coupe d'un nerf à deux axones, montrant un noyau de la gaine périneurale (N. Pn). La position d'un tel noyau, par rapport à la membrane basale interne du périneurium, permet de le distinguer immédiatement d'un noyau schwannien. De forme aplatie, le noyau du périneurium n'entraîne pas de modifications sensibles dans les contours des différentes parties du nerf. Les autres caractères de structure du nerf sont déjà donnés à propos de la Fig. 2. (x 6800).

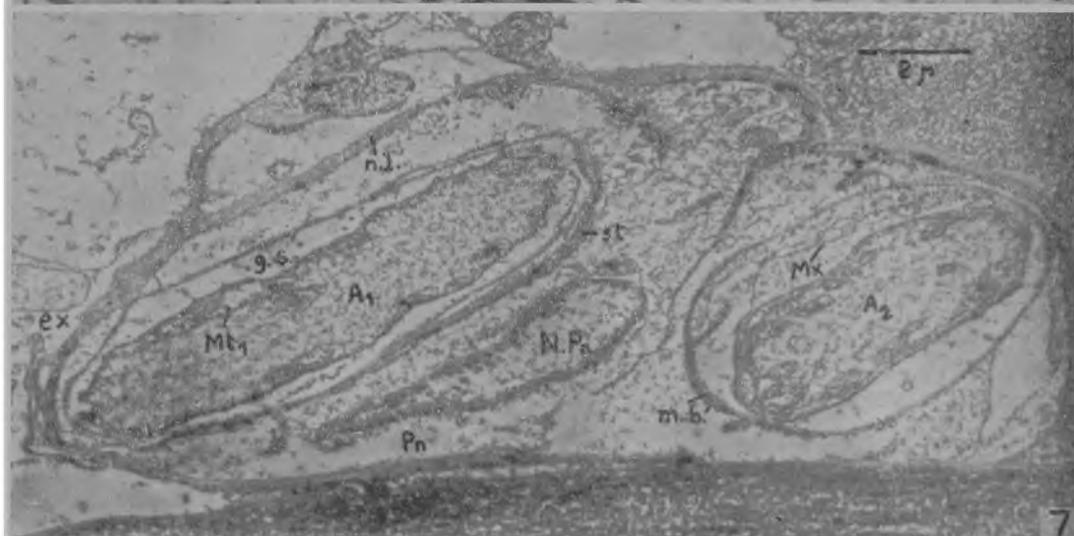
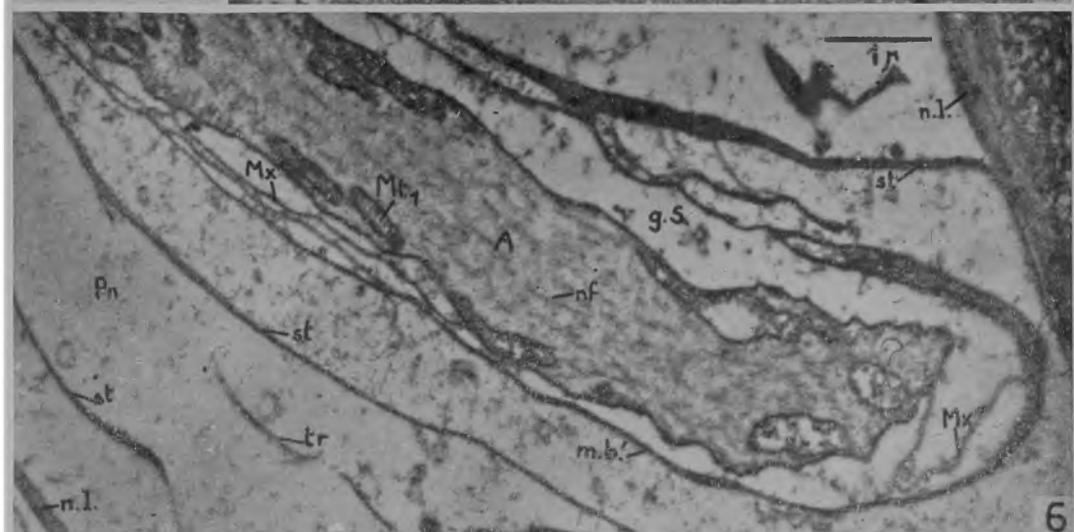
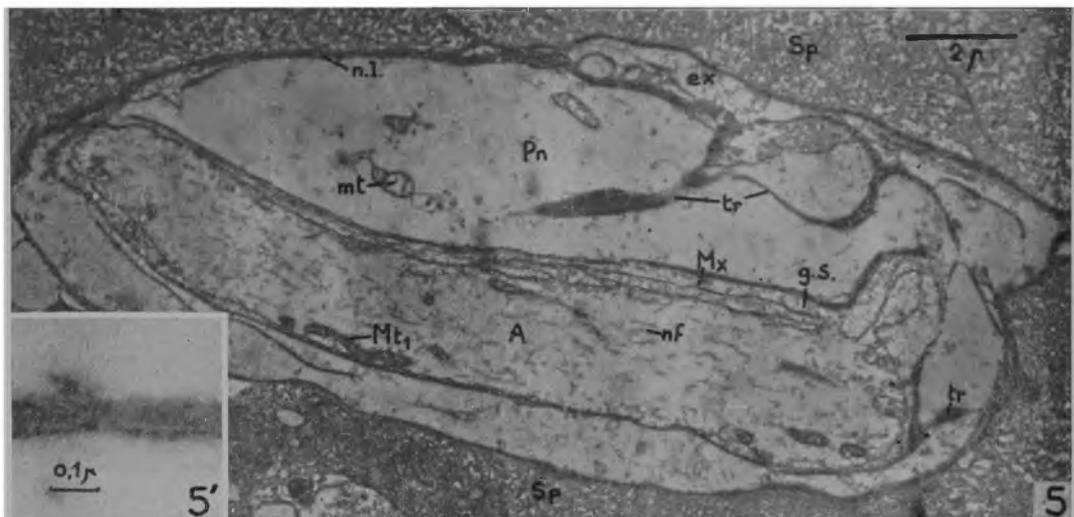


PLANCHE III

Fig. 8 — Coupe transversale d'une fibre musculaire passant par une zone de jonction myoneurale. Cette micrographie, effectuée à faible grossissement, résume les principaux caractères de la structure des fibres musculaires des maxillipèdes du Crabe Bleu: grande abondance de sarcoplasme (Sp); myofibrilles (Mf) groupées en colonnettes musculaires; mitochondries nombreuses et volumineuses, réparties en deux groupes, l'un (Mt₂') formant une couche continue sous la limite de la fibre musculaire, l'autre (Mt₂'') situé près des faisceaux de myofibrilles; reticulum endoplasmique (r. e.) localisé entre les myofibrilles; nombreuses granulations de glycogène (G1) par amas irréguliers dans tout l'ensemble du sarcoplasme.

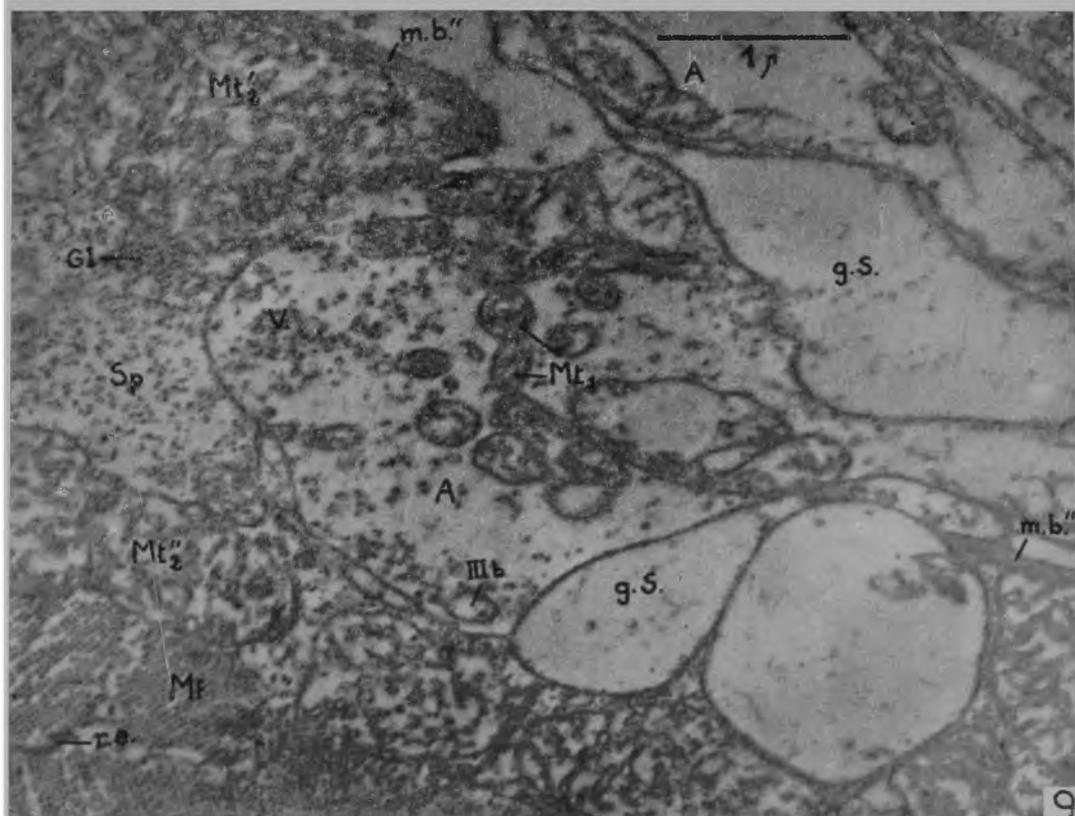
La zone synaptique est visible dans l'angle supérieur droit de la Fig.; elle est représentée par une dépression de la surface de la fibre musculaire dans laquelle est engagée l'extrémité de la fibre nerveuse (A). La profondeur de cette dépression est inférieure à l'épaisseur de la couche de sarcoplasme séparant les premières myofibrilles du sarcolemme. La majorité de la gaine de Schwann et toute la gaine péri-neuriale restent à l'extérieur de la dépression synaptique. La distribution des mitochondries du sarcoplasme n'est pas modifiée au niveau de la synapse de même que le reticulum n'y montre aucun développement particulier. (x 12000).

Fig. 9 — Micrographie électronique d'une jonction myoneurale sur une fibre musculaire en coupe transversale (même préparation que la Fig. 8). La membrane basale de la fibre musculaire (m. b.'') ne participe pas à la constitution de la dépression synaptique; on remarque sa brusque interruption au bord de la zone où la surface de la fibre musculaire se déprime; seule subsiste la membrane sarcoplasmique qui forme le fond de la dépression. Quelques prolongements de la gaine de Schwann (g. S.) sont engagés dans la partie latérale de la dépression synaptique, entre l'axone et la fibre musculaire. Dans l'axoplasme terminal, les mitochondries sont plus nombreuses et ont tendance à se grouper au centre, mais les neurofilaments ne sont plus discernables. Les vésicules synaptiques (V.), distribuées par groupes irréguliers, sont absentes auprès de la juxtaposition de l'axoplasme avec les parties de la gaine de Schwann engagées dans la dépression synaptique.

— IIIb: cf. légendes de la Fig. 10; autres légendes comme précédemment. (x 25000).



8



9

PLANCHE IV

Fig. 10 — Zone de jonction myoneurale sur une fibre musculaire en coupe radiale. La coupe est passée très latéralement dans la dépression synaptique, par un renforcement situé sous les bords de la membrane basale (m. b.) de la fibre musculaire, de telle sorte que cette dernière semble ininterrompue au-dessus de la terminaison nerveuse; cette interprétation peut être rendue concrète à l'aide de la Fig. 9, en imaginant le passage d'une coupe radiale dans l'extrémité gauche de la dépression synaptique. En outre, les dimensions réduites de la zone synaptique de la Fig. 10 et l'importance du compartimentage de la partie axoplasmique par les invaginations de l'axolemme confirment que seulement une portion réduite, parce que très latérale, de la dépression synaptique se trouve intéressée par la coupe et représentée sur la micrographie.

La juxtaposition des membranes plasmiques de la fibre musculaire et de la fibre nerveuse montre les dispositions suivantes:

— I = juxtaposition de l'axolemme (al) et de la membrane sarco-plasmique (m. s.) selon une surface régulière.

— IIIa = invagination de type simple de l'axolemme dans l'axoplasme.

— IIIb = invaginations de l'axolemme compliquées par des courbures, des angles, des bifurcations, déterminant un compartimentage de l'axoplasme terminal qui peut, sur coupe, isoler une fraction d'axoplasme, quand deux extrémités d'une bifurcation se sont rejointes.

Aucune modification particulière du reticulum endoplasmique n'est perceptible, bien qu'une ligne Z de la striation transversale des myofibrilles soit en évidence à proximité de la synapse. (x 52000).

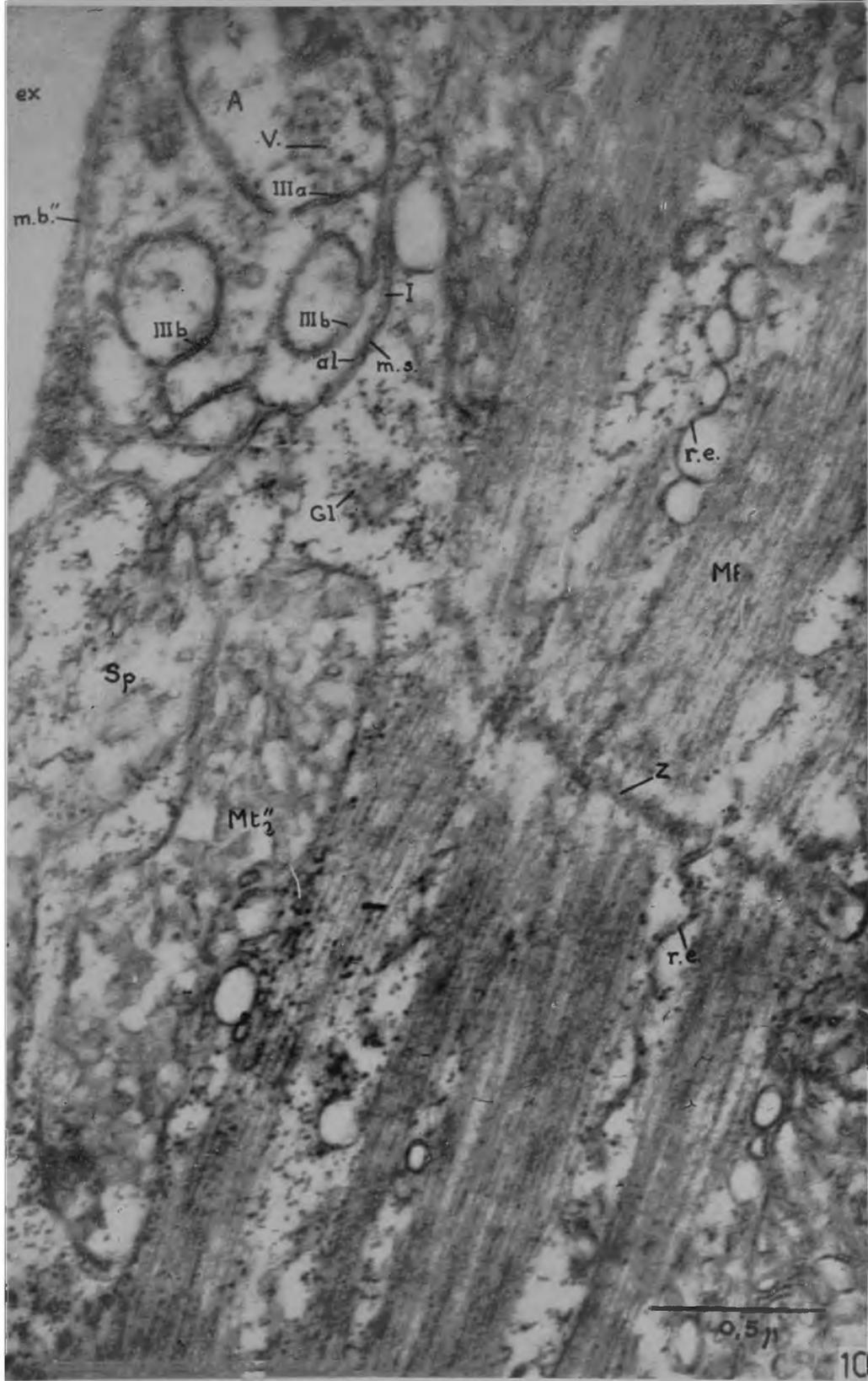


PLANCHE V

Fig. 11 — Micrographie électronique d'une zone de jonction myoneurale sur une fibre musculaire en coupe tangentielle. La dépression synaptique présente un contour elliptique, également visible sur la Fig. 13; entièrement comprise dans l'épaisse couche subsarcolemmale de sarcoplasme, elle est seulement entourée des mitochondries situées sous le sarcolemme; il n'y a pas de myofibrilles dans le champ de la micrographie. Cependant, la structure et les dimensions particulières des mitochondries du sarcoplasme et la présence des granulations de glycogène, permettent de reconnaître ce qui représente la fibre musculaire. Le contour de la dépression synaptique montre souvent des irrégularités de forme, recoupé par des cloisons incomplètes (Cl), ou même présentant à son voisinage comme des ébauches de ramifications de la terminaison nerveuse (A').

Les vésicules synaptiques sont distribuées inégalement par groupes d'importance variable; elles sont en général abondantes à la périphérie, à proximité de la juxtaposition de l'axolemme avec la membrane sarcoplasmique, le reste de l'axoplasme ne comportant que des vésicules isolées ou en petit nombre. En IIIb, une zone d'axoplasme délimitée par une invagination de l'axolemme présente une accumulation particulière de vésicules synaptiques. Aucune structure ne semble ici correspondre à des neurofilaments. (x 24000).

Fig. 12 — Agrandissement de la partie inférieure droite de la Fig. 11, montrant la juxtaposition des membranes plasmiques de l'axone et de la fibre musculaire:

— I = juxtaposition des deux types de membrane plasmique selon une surface régulière.

— IIc = une expansion d'axoplasme qui ne comporte pas d'interposition de sarcoplasme; les deux membranes en vis-à-vis sont axo-lemmiques.

— IV = replis profonds et sinueux de la membrane sarcoplasmique vers le sarcoplasme; les deux membranes juxtaposées sont sarcoplasmiques.

Dans l'axoplasme, les vésicules synaptiques offrent l'aspect habituel, avec une limite dense encerclant une zone centrale plus claire. A proximité d'un groupe de vésicules (flèche), les membranes plasmiques juxtaposées apparaissent plus denses. Légendes comme précédemment. (x 60000).

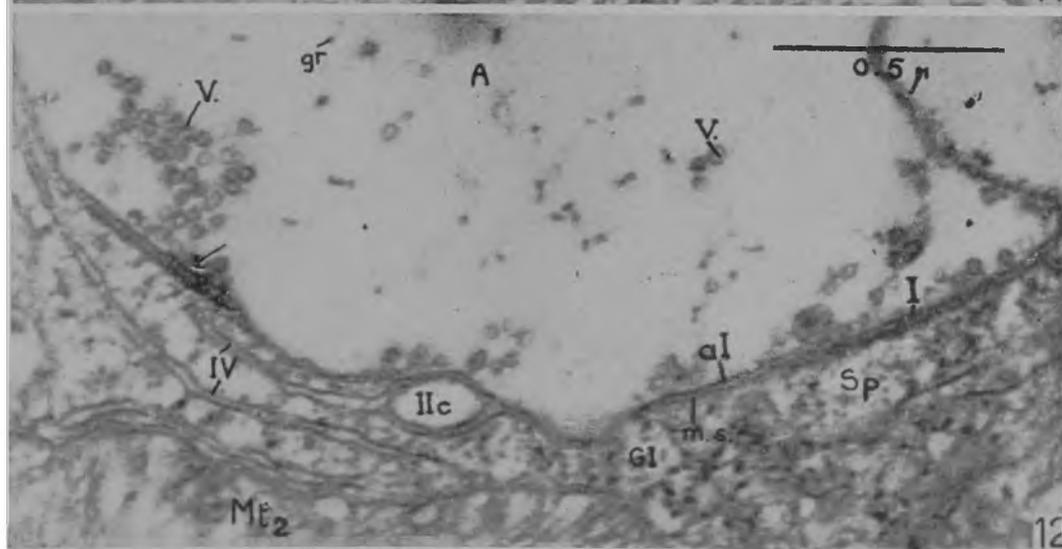
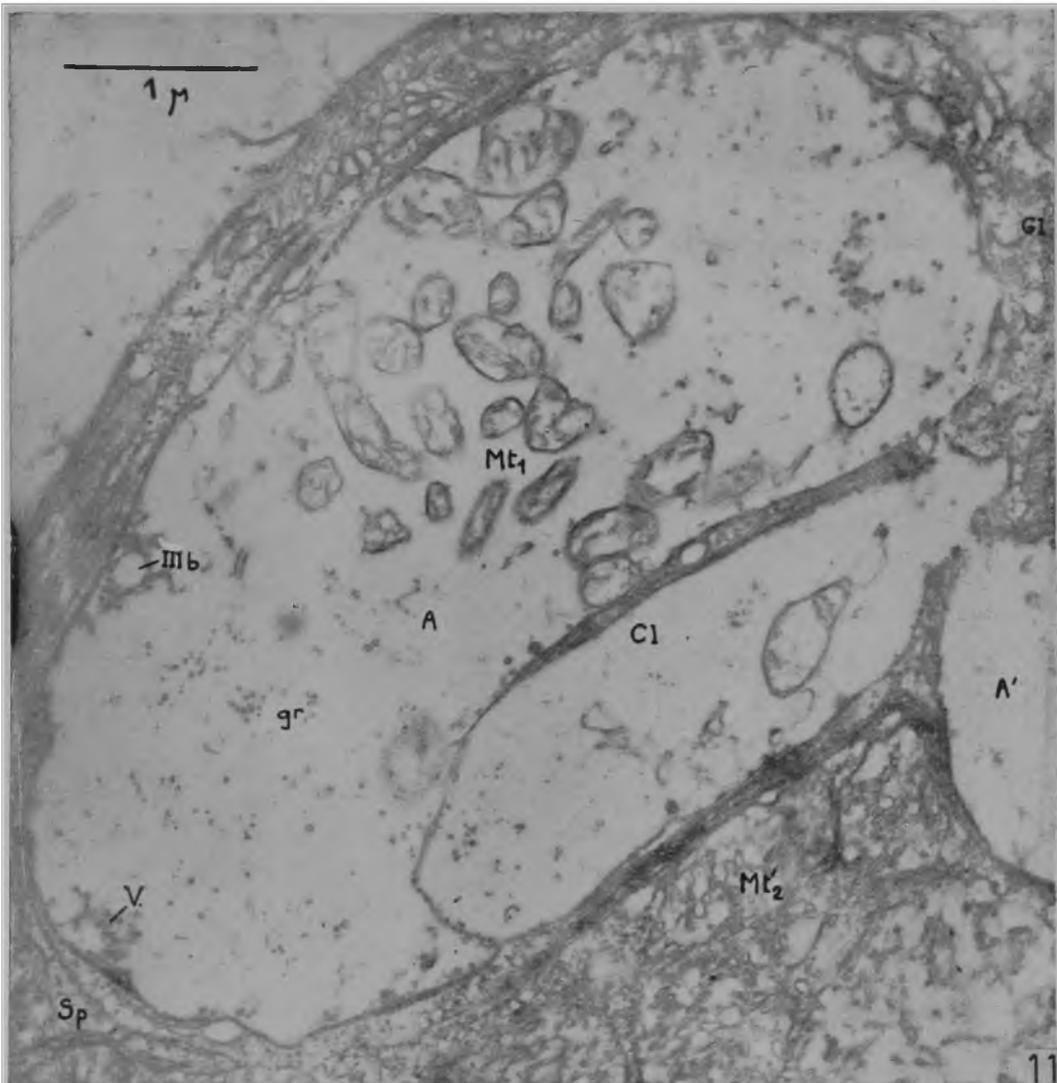


PLANCHE VI

Fig. 13 — Micrographie électronique de deux terminaisons nerveuses au contact d'une même fibre musculaire coupée tangentielle-ment. Les deux dépressions synaptiques ont des dimensions inégales, ce qui peut provenir soit d'une différence dans les diamètres des deux fibres nerveuses A_1 et A_2 , soit d'une différence dans le niveau du passage de la coupe à travers chaque dépression synaptique. La préparation comprend quelques myofibrilles (Mf) dans l'angle inférieur gauche; cela permet de confirmer que les grandes mitochondries (Mt_2), les granulations de glycogène (Gl) et les myofibrilles font partie d'une même organisation cellulaire correspondant à la fibre musculaire. Quelques prolongements de la gaine de Schwann (g. S.) sont insinués à certains endroits entre l'axone et la fibre musculaire.

Les mitochondries (Mt_1) de l'axoplasme terminal, de structure classique à lamelles, sont de formes très variées. Plus nombreuses que dans les nerfs juxtaterminaux, elles occupent tout le volume de l'axoplasme terminal ou peuvent même se grouper dans la partie centrale. La surface de coupe de la terminaison A_1 est couverte de structures très fines évoquant des neurofilaments de faible densité; elle comporte aussi les granules osmiophiles (gr) déjà vus dans l'axoplasme juxtaterminal. Les mitochondries du sarcoplasme (Mt_2) sont bien plus volumineuses que celles de l'axoplasme et présentent aussi une structure différente avec un réseau complexe de membranes à travers la matrice mitochondriale. Dans l'angle inférieur droit de la micrographie, un noyau du sarcoplasme (N. Sp) est visible avec des amas périphériques de chromatine et une double membrane percée de pores. (x 19500). Autres légendes comme précédemment.

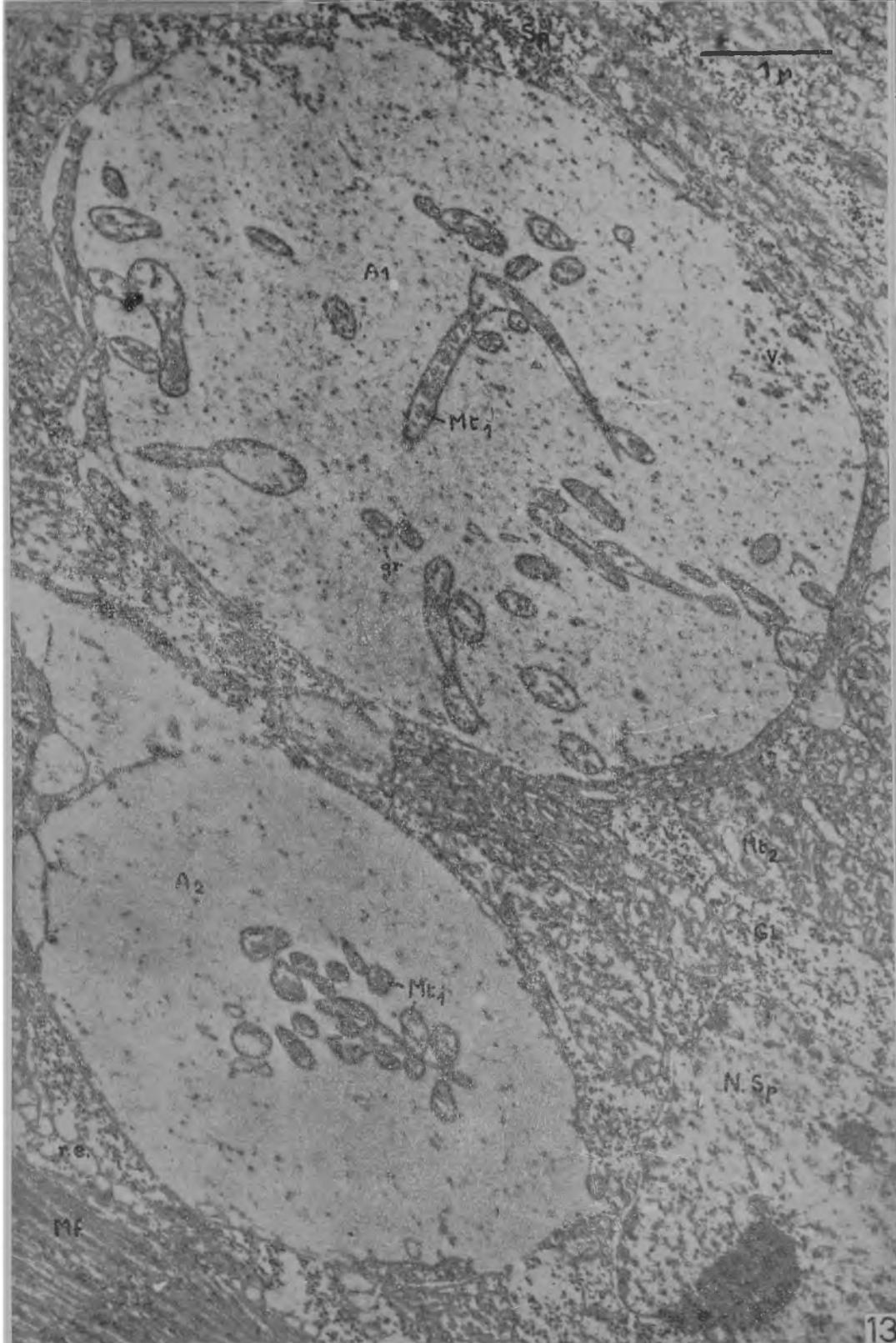


PLANCHE VII

Fig. 14 — Micrographie qui provient de l'agrandissement d'une région de la terminaison nerveuse A_2 de la Fig. 13. Elle présente en I une zone relativement développée où la juxtaposition des membranes plasmiques de la synapse conserve des contours simples et réguliers. N. Sp = noyau du sarcoplasme avec l'espace périnucléaire (c. n.). (x 39000).

Fig. 15 — Agrandissement d'une partie de la terminaison A_1 de la Fig. 13 pour montrer en IIb une expansion de l'axoplasme qui, du fait de la coupe, semble complètement isolée au milieu du sarcoplasme. Dans l'axoplasme, des structures fines de nature inconnue, ayant peut-être des relations avec la disparition des neurofilaments, sont abondantes entre les vésicules synaptiques (V.) et les granules osmiophiles (gr). (x 39000).

Fig. 16 — Agrandissement provenant également de la terminaison A_1 de la Fig. 13. En IIa, une zone de sarcoplasme s'interpose entre la terminaison nerveuse et une expansion d'axoplasme. En IIc, les contours irréguliers d'une expansion d'axoplasme paraissent, sur coupe, avoir complètement encerclé une zone de sarcoplasme. (x 43000). Les autres légendes comme précédemment.

